

THÈSE DE DOCTORAT

Soutenue à Aix-Marseille Université
le 24 mai 2022 par

Kévin Affannoukoué

Microscopie de fluorescence super-résolue par éclaircissements
aléatoires en configuration de réflexion totale interne

Discipline

Physique et
Sciences de la Matière

Spécialité

Optique, Photonique et
Traitement d'Image

École doctorale

ED 352
Physique et sciences de la matière

Laboratoire

Institut Fresnel
CNRS UMR 7249

Composition du jury

•	Alexandra FRAGOLA	Rapporteure
•	Laboratoire de Physique et D'Etudes des	
•	Matériaux, ESPCI Paris	
•	Delphine DEBARRE	Rapporteure
•	Laboratoire Interdisciplinaire de Physique,	
•	Université de Grenoble	
•	Olivier THEODOLY	Examineur
•	Laboratoire Adhésion Inflammation, Aix-	
•	Marseille Université	
•	Martin OHEIM	Examineur
•	Saints-Pères Paris Institute for the Neu-	
•	rosciences, Université de Paris	
•	Sandrine LEVEQUE-FORT	Présidente du jury
•	Institut des Sciences Moléculaires d'Orsay,	
•	Université Paris-Saclay	
•	Guillaume MAIRE	Directeur de thèse
•	Institut Fresnel, Aix-Marseille Université	

Affidavit

Je soussigné, Kévin Affannoukoué, déclare par la présente que le travail présenté dans ce manuscrit est mon propre travail, réalisé sous la direction scientifique de Guillaume Maire et Anne Sentenac, dans le respect des principes d'honnêteté, d'intégrité et de responsabilité inhérents à la mission de recherche. Les travaux de recherche et la rédaction de ce manuscrit ont été réalisés dans le respect à la fois de la charte nationale de déontologie des métiers de la recherche et de la charte d'Aix-Marseille Université relative à la lutte contre le plagiat.

Ce travail n'a pas été précédemment soumis en France ou à l'étranger dans une version identique ou similaire à un organisme examinateur.

Fait à Marseille le 18 octobre 2022

Kévin Affannoukoué




Cette œuvre est mise à disposition selon les termes de la [Licence Creative Commons Attribution - Pas d'Utilisation Commerciale - Pas de Modification 4.0 International](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).

Liste de publications et participation aux conférences

Liste des publications réalisées dans le cadre du projet de thèse :

- Md Rasedujjaman, **Kévin Affannoukoué**, Nicolas Garcia-Seyda, Philippe Robert, Hugues Giovannini, Patrick C. Chaumet, Olivier Theodoly, Marie-Pierre Valignat, Kamal Belkebir, Anne Sentenac, and Guillaume Maire, "Three-dimensional imaging with reflection synthetic confocal microscopy," *Opt. Lett.* 45, 3721-3724 (2020)
- Sheldon Decombe, François Loll, Laura Caccianini, **Kévin Affannoukoué**, Ignacio Izeddin, Julien Mozziconacci, Christophe Escudé and Judith Lopes. Epigenetic rewriting at centromeric DNA repeats leads to increased chromatin accessibility and chromosomal instability. *Epigenetics and Chromatin* 14, 35 (2021). <https://doi.org/10.1186/s13072-021-00410-x>
- **Kévin Affannoukoué**, Simon Labouesse, Guillaume Maire, Laurent Gallais, Marc Allain, Loic Legoff, Jérôme Idier, Thomas Mangeat and Anne Sentenac, "Super-resolved imaging under total internal reflexion using random illumination microscopy", soumis à *Nature Methods*

Participation aux conférences et écoles d'été au cours de la période de thèse :

- Poster, Journées d'Imagerie Optique Non-Conventionnelles, GDR ISIS / GDR Ondes, Mars 2020, Paris.
- Présentation (webinar), GDR Ondes, Mai 2021.
- Présentation, Optique Dijon 2021, Société Française d'Optique, Juillet 2021, Dijon.
- Poster, Ecole Thématique MIFOBIO 2021, Novembre 2021, Presque Ile de Giens.
- Présentation, Journées d'Imagerie Optique Non-Conventionnelles, GDR ISIS / GDR Ondes, Mars 2022, Paris.
- Présentation, Photonics Europe, SPIE, Avril 2022, Strasbourg.

Résumé

L'observation de structures biologiques au niveau de la membrane cellulaire en microscopie de fluorescence reste difficile. Il s'agit d'observer des objets très fins, peu intenses et peu contrastés à cause de la fluorescence provenant du volume de la cellule. La microscopie TIRF (Total Internal Reflection Fluorescence) est une méthode qui consiste à exciter la fluorescence de l'échantillon par un éclairage évanescent sur seulement quelques centaines de nanomètres. La microscopie TIRF est ainsi largement utilisée pour étudier les phénomènes biologiques se passant au voisinage de la lamelle. Cependant, la qualité des images est limitée par une résolution transverse de l'ordre de 200 nm et la présence plus ou moins forte de fluorescence hors focus résiduelle provenant de la diffraction de l'onde évanescente par l'échantillon. Pour améliorer la résolution du TIRF, la configuration SIM (Structured Illumination Microscopy) a déjà été utilisée et permet de gagner un facteur deux sur la résolution. Néanmoins, cette méthode est contraignante et difficile à mettre en œuvre, car le SIM nécessite une illumination sinusoïdale parfaitement connue. Or lorsque l'on travaille avec de grands angles, aux bords de l'ouverture numérique de l'objectif, ce dernier présente de fortes aberrations ce qui déforme la grille de lumière et rend la reconstruction des images très difficile. Le RIM (Random Illumination Microscopy) dans sa configuration TIRF permet d'atteindre une résolution équivalente au SIM (100 nm) ainsi que d'améliorer le sectionnement optique du TIRF sans avoir besoin de connaître l'illumination grâce à des éclairages aléatoires.

Le RIM est une nouvelle technique de microscopie super-résolue consistant à enregistrer plusieurs images du même échantillon sous des illuminations de speckle (éclairages aléatoires). L'image super-résolue est obtenue avec un algorithme d'inversion (algoRIM) permettant d'estimer l'objet à partir de la variance des images. AlgoRIM repose sur un modèle précis du lien entre la variance et l'objet et tire profit de la fonction d'autocorrélation des speckles pour doubler la résolution sans faire appel à des hypothèses de binarité ou de parcimonie de l'échantillon comme dans la plupart des techniques d'imagerie stochastique. L'intérêt de RIM réside dans sa facilité d'utilisation, en effet il n'est pas nécessaire de contrôler les illuminations. De plus ses performances produisent des images comparables à celles obtenues avec les microscopes super-résolus à éclairage structuré (SIM) nécessitant des illuminations connues. Dans cette étude, nous montrons que la méthode RIM peut être adaptée à la configuration en réflexion totale pour faire de l'imagerie super-résolue proche de la lamelle portant l'échantillon.

Pour implémenter RIM en configuration TIRF, nous avons modifié un microscope de fluorescence standard en remplaçant la lampe par une diode laser et en introduisant un diffuseur dans un plan conjugué au plan image puis un anneau dans le plan de Fourier de l'objectif. L'anneau est conçu pour laisser passer la lumière selon un cône d'angles supérieurs à l'angle critique entre la lamelle et le milieu où baignent les cellules. L'échantillon est ainsi illuminé avec un speckle évanescent. En tournant le diffuseur, plusieurs centaines d'images sont enregistrées sous différentes réalisations de speckle. Nous avons utilisé le TIRF-RIM sur des échantillons calibrés pour valider le gain en résolution apporté par cette méthode. Ensuite nous avons appliqué le TIRF-RIM à l'imagerie de filaments d'actine dans des cellules fixées en conditions réelles et ainsi démontré une amélioration significative de la résolution et du sectionnement optique par rapport aux images TIRF. Enfin, après validation sur échantillons fixes, nous avons utilisé notre système pour l'étude de la dynamique des nanoclusters de paxilline dans des macrophages avec une résolution sans précédent inférieure à 90 nm, obtenue à l'aide d'objectifs TIRF standard d'ouverture numérique 1.49.

Abstract

Imaging biological structures at the level of the cell membrane with fluorescence microscopy is tough. It consists in imaging very thin structures in conditions of low intensity and low contrast due to the fluorescence background from the whole cell. TIRF (Total Internal Reflection Fluorescence) microscopy is a method based on exciting the fluorescence of the sample with an evanescent illumination over a depth range of only a few hundred nanometers. TIRF microscopy is thus widely used to study biological phenomena occurring in the vicinity of the slide. However, the quality of the images is limited by a transverse resolution of about 200 nm and the existence of residual out-of-focus fluorescence due to the sample diffracting the illuminating evanescent wave. To improve the resolution of TIRF, the SIM (Structured Illumination Microscopy) configuration has been developed and allows to gain a factor two on the resolution. Nevertheless this method is restrictive and difficult to implement because SIM requires a perfectly known sinusoidal illumination. However, when working with wide angles, at the edges of the numerical aperture of the lens, the latter has strong aberrations which distorts the light grid and makes the reconstruction of images very difficult. RIM (Random Illumination Microscopy) in its TIRF configuration allows to reach a resolution equivalent to SIM (100 nm) as well as to improve the optical sectioning of TIRF with no need to know the illumination thanks to random illuminations.

RIM is a new super-resolved microscopy technique consisting in recording several images of the same sample under speckle illuminations. The super-resolved image is obtained with an inversion algorithm (algoRIM) allowing to estimate the object from the variance of the images. AlgoRIM relies on an accurate model of the relationship between variance and object and takes advantage of the speckle autocorrelation function to double the resolution without making assumptions about binarity or sample sparsity as in most stochastic imaging techniques. The interest of RIM lies in its ease of use, indeed it is not necessary to control the illuminations. Moreover, its performances produce images comparable to those obtained with super-resolved structured illumination microscopes (SIM) requiring known illuminations. In this study, we show that RIM can be adapted to the total reflection configuration for near-slide super-resolved imaging.

To implement RIM in TIRF configuration, we modified a standard fluorescence microscope by replacing the lamp with a laser diode and introducing a diffuser in a plane conjugate to the image plane and then a ring in the Fourier plane of the objective.

The ring is designed to let the light pass through a cone of angles greater than the critical angle between the coverslip and the medium in which the cells are immersed. The sample is thus illuminated with an evanescent speckle. By rotating the diffuser, several hundred images are recorded under different speckled illuminations. We used TIRF-RIM on calibrated samples to validate the gain in resolution brought by this method. Then we applied TIRF-RIM to the imaging of actin filaments in fixed cells under real conditions and thus demonstrated a significant improvement in resolution and optical sectioning compared to TIRF images. Finally, after validation on fixed samples, we used our system to study the dynamics of paxillin nanoclusters in macrophages with an unprecedented sub-90 nm resolution, obtained with standard TIRF objectives of numerical aperture 1.49.

Remerciements

Les travaux présentés dans ce manuscrit sont le résultat de trois années de thèse durant lesquelles j'ai eu la chance de rencontrer de nombreuses personnes qui ont toutes participé, de près ou de loin, à sa réussite.

Je tiens en premier lieu à remercier Guillaume Maire, mon directeur de thèse, et Anne Sentenac, co-encadrante, sans qui cette thèse n'aurait pas été possible. Merci pour la confiance que vous m'avez accordée et pour votre grande implication tout au long de ces années à l'Institut Fresnel. J'ai eu énormément de chance de vous avoir comme encadrants et ai beaucoup appris grâce à vous, aussi bien sur le plan expérimental que numérique et théorique. Merci également aux autres membres de l'équipe SEMO, en particulier Patrick, Kamal et Hugues, pour vos conseils et nos discussions très enrichissantes.

Je souhaite ensuite remercier tous les membres du jury : Alexendra Fragola, Delphine Debarre, Olivier Théodoly, Martin Oheim et Sandrine Levêque-Fort, pour la lecture de ce manuscrit et votre participation à la soutenance de thèse. Vos retours furent très constructifs et la discussion scientifique passionnante.

J'adresse un très grand merci à Thomas Mangeat ainsi qu'à Claire Estibale du CBI de Toulouse. Merci Thomas de m'avoir accueilli de ton laboratoire pour quelques semaines et surtout pour les nombreuses manip que tu as poursuivies pendant les mois qui ont suivis. Claire, tu as accompli un travail monstrueux pour développer l'interface d'AlgoRIM, que j'ai intensément utilisé pendant les derniers mois.

J'aimerais maintenant remercier un grand nombre de personnes de l'Institut Fresnel, qui ont également contribué au succès de cette thèse. Merci à Julien Savatier qui m'a formé à la culture cellulaire ainsi qu'au marquage fluorescent. Merci pour ton temps et ta pédagogie, j'ai eu le privilège d'avoir de nombreuses heures de formation théorique et pratique à tes côtés. J'ai finalement pu avoir mes propres cellules pour tester, perfectionner et valider mon montage expérimental, qui a été une étape clé de ce travail de thèse. Je souhaite également remercier Laurent Gallais qui a réalisé la gravure de mes anneaux, composant indispensable au montage que j'ai développé. Cette thèse n'aurait pas été la même sans mes collègues de bureau, Kévin et Rased. Merci Kévin d'être venu à mon secours lorsque je me débatais avec cette satanée

distribution Linux qu'est Fedora. Rased, nous avons commencé nos thèse le même jour et nous nous sommes mutuellement aidés et supportés pendant ces trois ans, que cela soit scientifiquement et moralement. Merci aussi aux équipes de gestion, supports technique et informatique qui permettent de faire fonctionner le laboratoire.

Pendant ces années de thèse, j'ai eu la chance de pouvoir enseigner à l'IUT d'Aix-Marseille Université. Je tiens donc à remercier toute l'équipe pédagogique du DUT Mesure Physique, Valérie Kazarian, Thomas Bégou, Kostas Iliopoulos et Hugues Giovanini qui m'ont accueilli et accompagné dans cette mission.

Je tiens à remercier tous les doctorants, post-docs et stagiaires de l'Institut Fresnel avec qui j'ai partagé ma vie quotidienne, au laboratoire et en dehors pendant ces années à Marseille. Merci à Camille, Faris, Cyprien pour votre soutien, bonne humeur et pour tous ces bons moments. Ces années à Marseille resteront inoubliable en partie grâce à vous. Merci également à François, Mohamed, Paul, Adrien, Astrid, Matthieu, Marin, Marine ainsi que tous les membres de MEMO.

Un petit mot pour tous mes super colocs du 34 Delanglade, Anne-Claire, Aurélien, Henri, Alix, Lou, Marie, Charlotte, Joris. J'ai adoré partager cette période de ma vie avec vous.

Si je suis arrivé jusqu'ici, c'est aussi grâce à ceux qui me soutiennent depuis bien des années avant mon arrivée à Marseille. Merci à Rayane, Mel, Oualid. Merci à mes amis de Jussieu, Ali, Basile, Violette, Mathis, Bach-Mai, Massilia. Vous avez tous participé à votre façon à l'aboutissement de cette thèse.

Enfin merci à maman qui a toujours été là pour moi, ainsi qu'à ma sœur et mon frère, qui me soutiennent depuis si longtemps.

Ma Lili, merci pour ton soutien sans faille depuis le début. Merci pour tout ce que tu es.

Table des matières

Affidavit	2
Liste de publications et participation aux conférences	3
Résumé	4
Abstract	6
Remerciements	8
Table des matières	10
Table des figures	12
1 Sectionnement optique en microscopie de fluorescence	22
1.1 Introduction	22
1.2 Microscopie de fluorescence	23
1.2.1 Principe fonctionnement d'un microscope de fluorescence	23
1.2.2 Limite de résolution en microscopie de fluorescence	25
1.2.3 Fonction de transfert optique 3D	29
1.2.4 Illustration sur données réelles	30
1.3 Méthodes de sectionnement optique en microscopie de fluorescence	31
1.3.1 Méthodes numériques	31
1.3.2 Confinement de l'excitation	33
1.4 Principe du TIRF	36
1.4.1 Réflexion totale et ondes évanescentes	36
1.4.2 Performances et limitations du TIRF	40
1.5 Microscopie super-résolue en configuration TIRF	44
1.5.1 Microscopie à illumination structurée	44
1.5.2 Microscopie par détection de molécules uniques	49
1.5.3 Microscopie STED	52
1.6 Conclusion	52
2 Microscopie super-résolue par éclairagements aléatoires	54
2.1 Introduction	54
2.2 Principes du RIM	55
2.2.1 Reconstruction statistique des images	55
2.2.2 Robustesse aux aberrations	57

2.2.3	Pouvoir de sectionnement du RIM	58
2.3	Théorie	59
2.3.1	Modélisation des données RIM	59
2.3.2	Capacité de super-résolution du RIM	60
2.3.3	Algorithme de reconstruction	62
2.4	Application du RIM en configuration de réflexion totale interne	69
2.4.1	Intérêt du TIRF-RIM	69
2.4.2	Speckles évanescents	71
2.5	Conclusion	75
3	Simulations numériques	76
3.1	Introduction	76
3.2	Modèle	76
3.3	Résolution RIM vs RIM-TIRF sur objet 2D	80
3.4	Uniformité de l'éclairement fonction du nombre de speckles	84
3.5	RIM vs SIM en congiguration TIRF	88
3.5.1	Fuites	88
3.5.2	Décalage de Stokes	91
3.6	Conclusion	92
4	Résultats expérimentaux	94
4.1	Introduction	94
4.2	Description du montage expérimental	95
4.2.1	Description générale	95
4.2.2	Réalisation et alignement du masque	99
4.2.3	Vérification du caractère évanescent des illuminations	102
4.3	Performances du montage	104
4.3.1	Mesure de la PSF	104
4.3.2	Dérive latérale du microscope	106
4.3.3	Uniformité de la détection	107
4.4	Résultats sur échantillons fixes	108
4.5	Résultats sur microscope avec SLM et adapté pour le vivant	112
4.5.1	Description du montage	112
4.5.2	Comparaison RIM, TIRF-RIM et TIRF-SIM	115
4.5.3	Dynamique des podosomes	118
4.6	Préparation des échantillons	122
4.7	Conclusion	122
	Conclusion	123
4.8	Conclusion	123
4.9	Perspectives	125
4.9.1	Speckles guidés	125
4.9.2	TIRF-RIM axialement résolue	126
	Bibliographie	128

Table des figures

1.1	Diagramme de Jablonski et spectre de fluorescence	23
1.2	Méduse <i>Aequorea victoria</i> dont a été extraite la première GFP et la protéine correspondante.	24
1.3	Principe de la microscopie en épi-fluorescence. Une source lumineuse monochromatique (une diode laser ou une source de lumière blanche passant au travers d'un filtre d'excitation) est dirigée vers l'échantillon à observer. Les fluorophores fixés sur les structures d'intérêt absorbent la lumière puis émettent un rayonnement de fluorescence à une longueur d'onde supérieure à l'excitation. La fluorescence est collectée par l'objectif de microscope puis détectée sur le détecteur.	25
1.4	Fonction d'Airy. C'est une fonction qui s'écrit en fonction d'une fonction de Bessel à symétrie radiale présentant un lobe principal et des lobes secondaires. Le premier zéro de la fonction d'Airy se trouve à $\frac{0.61\lambda}{NA}$ et définit la limite de résolution selon le critère de Rayleigh.	26
1.5	Modèle simplifié d'un microscope optique proposée par Streibl [100].	28
1.6	Fonction de Transfert Optique du microscope	30
1.7	Perte de contraste due à la fluorescence hors-focus	31
1.8	Support de l' <i>OTF</i> en microscopie confocale (traits pleins rouges) comparé à celui obtenu avec une illumination uniforme (pointillés bleus). A gauche dans le plan $(\mathbf{k}_x, \mathbf{k}_y)$ et à droite dans le plan $(\mathbf{k}_x, \mathbf{k}_z)$	33
1.9	Réflexion totale frustrée	35
1.10	Définition des composantes <i>TE</i> et <i>TM</i> lors de la réflexion d'une onde électromagnétique à une interface définie par les milieux d'indices n_1 et n_2	37
1.11	Décomposition des vecteurs d'ondes incidents et transmis à l'interface définie par les milieux d'indices n_1 et n_2 en leurs composantes longitudinales et transverses	40
1.12	Cellule non-marquée dans de la fluorescéine. Image TIRF avec incidence dans une direction et avec illumination tournante (spTIR). Tirée de [15]	41
1.13	Réflexion totale frustrée	42

1.14	Principe de la microscopie par illumination structurée. Une excitation sinusoïdale est créée en faisant interférer deux faisceaux dans le plan focal objet. La superposition de la grille de lumière sinusoïdale avec les hautes fréquences de l'objet crée un effet de Moiré (modulation basse fréquence). Dans cette modulation sont encodées les informations permettant de retrouver les hautes fréquences de l'objet. Une rotation de la grille de lumière permet alors de faire une reconstruction isotrope de l'objet.	45
1.15	a) Décalage des fréquences de l'objet sous illumination structurée à l'intérieur de l'OTF. b) Domaine de l'espace de Fourier dans le plan transverse couvert par 9 images SIM. c) Domaine de l'espace de Fourier dans le plan $(\mathbf{k}_x, \mathbf{k}_z)$ lorsque la fréquence de l'excitation est proche de la fréquence de coupure du microscope. Dans ce cas la résolution quasiment améliorée par deux mais aucun gain supplémentaire n'est apporté selon l'axe optique (toujours présence du <i>missing cone</i>). d) La fréquence de l'illumination est réduite de moitié par rapport à c), la résolution latérale est réduite, mais l'information manquante selon z à la fréquence nulle est apportée et permet un meilleur sectionnement optique. Adaptée de [61] et [34]	47
1.16	Principe de la microscopie par détection de molécules uniques. Lorsque chaque point de l'objet (cercle jaune) émet de la fluorescence simultanément, les PSF de chaque point se recouvrent. En détectant les molécules une par une il est possible de localiser le centre de chacune des PSF par un <i>fit</i> gaussien pour ensuite reconstruire l'objet dont la résolution est la précision de localisation des molécules. Tirée de [63]	51
2.1	Principe du RIM. L'échantillon est éclairé par des illuminations de speckle. N images, limitées par la diffraction, sont enregistrées. La variance des images est ensuite donnée en entrée de l'algorithme de reconstruction (AlgoRIM) ainsi que la fonction d'autocorrélation des speckles et la PSF du microscope.	57
2.2	Speckles avec aberrations, astigmatisme et coma. Ligne 1, PSF entachées d'aberrations, astigmatisme (centre) et coma (droite). Ligne 2, fonctions d'autocorrélations. Ligne 3, speckles correspondants. Les fonctions d'autocorrélations et les speckles ne sont pas impactés par les aberrations, ils sont identiques au cas idéal (colonne 1).	58
2.3	Origine du sectionnement optique apporté par le RIM. La contribution de la fluorescence hors-focus étant approximativement la même sur toutes les images, sa contribution sur la variance est nulle.	59
2.4	Déconvolution	64

2.5	a) Évolution de l'intensité de fluorescence moyenne d'une cellule en fonction du nombre d'illuminations de speckle. b) Écart-type calculé à partir de la variance telle que défini équation 2.29. c) Écart-type calculé à partir de la variance d'Allan telle que définie équation 2.30. Sur le zoom, on peut voir que les lignes verticales dues au bruit de lecture de la caméra, toujours présentes sur b) ont été supprimées.	67
2.6	a) Illumination en sortie de l'objectif pour différentes positions de focalisation du laser dans le plan focal arrière. b) Représentation du plan focal arrière et position de focalisation du laser pour les différentes configurations représentées en a). Le domaine de réflexion totale est indiqué en vert. c) Positionnement du filtre en forme d'anneau. L'image du masque est formée par l'association de deux lentilles (montage $4f$) dans le plan focal arrière de l'objectif.	71
2.7	Speckle évanescent a) et propagatif b). Bar d'échelle une unité de λ_0 . c) Fonction d'autocorrélation des speckles évanescent (gauche) et propagatif (droite). d) Spectre des fonctions d'autocorrélation des speckles évanescents (gauche) et propagatifs (droite). e) Profils d'intensité des fonctions d'autocorrélations des speckles. f) Profils d'intensité des spectres des fonctions d'autocorrélations.	74
3.1	PSF simulée $H_{obs}(\mathbf{r}, z)$. a) Dans le plan focal $H_{obs}(\mathbf{r}, z = 0)$. b) Vue en coupe dans le plan $x - z, y = 0$. Barre d'échelle 1 unité de λ	77
3.2	Speckle évanescent/propagatif et évolution de l'intensité moyenne en fonction de z . Barre d'échelle 1 unité de λ_0	79
3.3	Ligne 1 : Objet, image plein champ déconvoluée. Ligne 2 : Images brut (RIM et TIRF-RIM). Ligne 3 : Reconstructions RIM (gauche) et TIRF-RIM (droite). Les cercles rouge et jaune indiquent la limite de résolution de l'image plein champ et RIM respectivement.	81
3.4	Haut : Images brutes et reconstructions RIM et TIRF-RIM pour différents budgets de photons. Bas : Évolution de la fonction erreur en fonction du budget de photons.	83
3.5	Évolution du coefficient de variation CV sur les images de variances en fonction du nombre d'images N (gauche). Évolution de la différence d'images ΔN entre propagatif et évanescent en fonction de CV (droite)	84
3.6	Évolution du coefficient de variation CV sur la variance de l'illumination en fonction du nombre d'images N (gauche). Évolution du coefficient de variation CV sur les images de variances pour des speckles propagatifs à différentes longueurs d'ondes d'émissions.	85
3.7	CV calculé sur le barreau en fonction du nombre d'illuminations et les reconstructions TIRF-RIM (cadre bleu) et RIM (cadre orange).	86

3.8	Reconstructions en fonction du nombre d'illuminations. Haut, reconstruction RIM et TIRF-RIM pour différent nombre de speckles. Bas, erreur en fonction du nombre de speckles utilisés. Moyennes et incertitudes sont représentées et ont été obtenues à partir de 20 réalisation pour ($N_{speckle} \leq 100$), 10 réalisations sinon. En encart <i>p-values</i> , résultats d'un test de Student.	87
3.9	Objet 3D. Billes fluorescentes au-dessus de la mire de résolution (étoile de Siemens) à imager.	88
3.10	Intensité moyenne en fonction de z d'un speckle évanescent pour différents niveaux de fuites.	89
3.11	TIRF-RIM vs SIM-TIRF avec 5% de fuites. a) Objet dans le plan $z = 0$, b) une image brute SIM, c) reconstruction avec fairSIM, d) image TIRF déconvoluée, e) une image brute RIM, f) reconstruction TIRF-RIM avec algoRIM.	90
3.12	Reconstruction TIRF-RIM (ligne 1) et TIRF-SIM (ligne 2) pour différents pourcentages de fuites allant de 0 à 10%.	91
3.13	Images de l'étoile avec une illumination structurée (ligne 1), reconstructions TIRF-SIM (ligne 2) et TIRF-RIM (ligne 3) pour différentes longueurs d'ondes de détection.	92
4.1	Montage expérimental. Une diode laser éclaire un diffuseur monté sur un moteur tournant. Le diffuseur génère un speckle dans le plan focal de l'objectif où se trouve l'échantillon. Un filtre spatial en forme d'anneau coupe les rayons n'étant pas en réflexion totale sur l'interface où se trouve l'échantillon. Les plans indiqués par des pointillés vert sont des plans conjugués avec le plan focal de l'objectif, les rouges avec le plan focal arrière de l'objectif, <i>Back Focal Plane</i> , abrégé en BFP. La lentille de tube L_T forme l'image de l'objet dans le plan du détecteur de la caméra sCMOS.	96
4.2	Images de speckles obtenues par réflexion sur un miroir situé dans le plan focal de l'objectif. Sur la première colonne sont représentés des speckles obtenus sans masque dans le plan de Fourier et recouvrant donc toute la pupille et évanescents obtenus avec le masque, en filtrant donc les ondes planes n'étant pas en réflexion totale en polarisation circulaire et linéaire. Sur la deuxième colonnes sont représentés les spectres fréquentiels des speckles obtenus par transformée de Fourier.	98
4.3	Comparaisons des fonctions d'autocorrélation des speckles. a) Autocorrélation d'un speckle propagatif obtenue expérimentalement et par simulation (ligne 1). Même chose dans le cas d'un speckle évanescent (ligne 2). b) Comparaison simulation/expérience des profils d'intensité du spectre de la fonction d'autocorrélation du speckle propagatif et évanescent.	99

4.4	Observation de la pupille de l'objectif. a) Schéma (pas à l'échelle) du montage expérimental modifié où toute la pupille de l'objectif est éclairée. Une lentille supplémentaire L_S est insérée dans le statif du microscope pour faire l'image de plan focal arrière de l'objectif (BFP). Les rayons incidents avec un angle inférieur à θ_c sont transmis, ceux supérieurs à θ_c sont réfléchis et forment un anneau sur la caméra. b) Image obtenue lorsque dans le plan focal se trouve une interface verre-air et air-eau. Le grandissement entre la pupille et la caméra est connu et permet donc de déterminer les dimensions de l'anneau de réflexion totale. c) Photographie du masque sur sa translation $x - y$. d) Image du masque (vert) superposée à l'image du plan focal arrière (rouge).	101
4.5	Moyenne des images de diffraction obtenues avec des éclairagements de speckles propagatifs et évanescents. Dans le cas propagatif l'image est prise au centre de la bille et nous permet de retrouver son diamètre ($6\mu m$). Dans le cas évanescent l'image est faite au niveau de l'interface. On observe un fond clair correspondant à l'excitation réfléchi à l'interface et une tache sombre au centre, où la bille est en proche contact de l'interface. Le champ évanescent est converti en champ propagatif et ne revient pas sur la caméra. La circonférence de la bille mesurée avec l'image obtenue avec les speckles propagatifs est indiqué en pointillés rouges.	103
4.6	Dérivation pour contrôler l'illumination. À l'aide d'une lame demi-onde et d'un cube séparateur polarisant, le laser peut être dirigé vers le diffuseur pour créer l'illumination de speckle ou vers le miroir ajustable pour une illumination de type onde plane.	104
4.7	Estimation de la PSF. a) Image de billes fluorescentes de 100 nm de diamètre. Sont indiquées en rouges celles détectées qui n'ont pas été filtrées. b) Transformée de Fourier de a), le rayon du support de l'OTF peut être estimé à environ $1/280\mu m^{-1}$. c) Distribution de la largeur à mi-hauteur des billes détectées, la médiane indiquée en rouge se trouve à 292 nm et l'écart-type est de 14 nm (échantillon de 610 billes). d) Simulation comparant le profil d'intensité d'une PSF idéale (source ponctuelle) et de l'image d'une bille de 100 nm.	106
4.8	Dérive latérale du microscope. a) Déplacement de la bille selon les axes x et y en fonction du temps. b) Trajectoire de la bille dans le plan $x - y$	107
4.9	Fonctionnement du <i>rolling shutter</i> . À cause du temps de lecture de la caméra, la dernière rangée de pixels est moins exposée que la première. Cela a pour effet de créer un gradient d'intensité sur l'image.	108

4.10	a) Image plein champ et reconstruction TIRF-RIM sur la mire Argolight. En plein champ les lignes espacées de 300 nm sont discernables mais pas celles de 270 nm. Les lignes séparées de 150 nm sont bien résolues après la reconstruction TIRF-RIM. b) Une image brute de speckle d'une cellule COS-7 dont l'actine a été marquée par Alexa488. c) et d) images plein champ et reconstruction TIRF-RIM de la même cellule qu'en a). e) Zoom sur les régions encadrées en c) et d). f) Profil d'intensité le long des pointillés sur les lignes espacées de 150 nm de a). g) Profil d'intensité le long des pointillés de d).	110
4.11	Exemples de résultats sur cellules fixées (COS-7 actine marquée avec Alexa488). Triangles supérieurs : images TIRF déconvoluées. Triangles inférieurs : reconstruction TIRF-RIM. Echelle $10\mu m$	111
4.12	Les images sont enregistrées de manière séquentielle grâce à un DAQ qui déclenche l'affichage du motif sur le SLM à partir d'un signal TTL provenant de la caméra sCMOS. Le SLM permet de générer un faisceau de Bessel avec des phases aléatoires. Le masque en forme d'anneau est placé dans le plan focal objet de la lentille L_1 et permet de laisser passer le faisceau de Bessel et de filtrer la lumière résiduelle qui ne serait pas en réflexion totale. Le signal de fluorescence est collecté par l'objectif de microscope (100X, NA 1.49) et un filtre dichroïque permet de faire l'imagerie en deux couleurs en séparant les deux longueurs d'ondes sur deux caméras.	113
4.13	Génération des speckles évanescents avec un SLM. Sur le SLM sont multipliés un masque de phases aléatoires avec un masque d'anneaux concentriques. Le période des anneaux est choisie en utilisant la formule des réseaux.	115
4.14	a) Reconstructions RIM et TIRF-RIM avec 100 et 400 illuminations. Avec 400 illuminations on constate que la résolution du TIRF-RIM est légèrement meilleure que le RIM. b) Comparaison des fluctuations de RIM et TIRF-RIM. Quatre images de variances ont été formées à partir de 100 images de speckles. L'écart type de ces quatre images est ici représenté. Les fluctuations du RIM avec des speckles propagatifs sont plus importantes qu'avec des speckles pseudo-évanescents. c) et d) images champ large de la mire Argolight, plein champ et reconstruction TIRF-RIM respectivement. Avec la reconstruction TIRF-RIM les lignes séparées de 90 nm sont nettement distinguables et celles de 60 nm le sont presque. . .	117
4.15	a) et b) images plein champ et reconstruction TIRF-RIM respectivement. c) et e) images brutes TIRF-SIM et TIRF-RIM. Les acquisitions étant faite à budget de photons constant les images SIM (9 images) sont moins bruitées que les images RIM (400 images). d) reconstruction TIRF-SIM qui a échoué et f) reconstruction TIRF-RIM.	118

4.16	Dynamique de la paxilline et de la F-actine sur des podosomes de macrophages. Les reconstructions TIRF-RIM sont faites à partir de 100 images de speckle. A) Image deux-couleurs du réseau de F-actine (magenta) et paxilline (vert). B) Comparaison entre l'image de paxilline d'un macrophage fixe (400 speckles) et d'un vivant (100 speckles). La résolution sur le macrophage fixe (gauche) est estimée à environ 86 nm et sur le vivant (droite) à 96 nm. C) Image couleur encodée temporellement de la dynamique d'un podosome suivi pendant 3 min. D) Étude des trajectoires de paxilline avec TrackMate. En haut à gauche, zoom sur un podosome. En haut à droite, nanoclusters de paxilline détectés. En bas à gauche, trajectoires des nanoclusters. En bas à droite, statistique de la vitesse maximum des nanoclusters. Ceux à proximité (moins de $1\mu m$) d'un centre de podosome sont plus lents que les autres (interpodosomes).	120
4.17	Comparaison des trajectoires mesurées des nanoclusters de paxilline sur un macrophage vivant (gauche) et fixé (à droite). Cette expérience de contrôle confirme que les trajectoires observées des nanoclusters de paxilline ne sont pas des artefacts mais bien une mesure de la dynamique de l'échantillon. Cela permet également d'estimer la sensibilité de la méthode de suivie, elle est inférieure à $0.005\mu m/s$.	121
4.18	Vue de coté (gauche) et de dessus (droite) du système utilisé pour créer les speckles évanescents guidés. Des fibres optiques de faibles ouvertures numériques sont approchées de la tranche de la lamelle de verre sur laquelle se trouve l'échantillon.	126
4.19	a) Signal SAF pour différentes positions d'une molécule fluorescente par rapport à une surface. Plus la molécule est proche plus le signal SAF est important. b) Détection simultanée du signal EPI=UAF+SAF et du signal UAF. En faisant la différence des deux le signal SAF peut être déterminé. Le rapport du nombre de photons SAF/UAF permet de déterminer la position axiale du fluorophore. Tirée de [14].	127

Introduction

Le mot *microscopie* nous vient du grec ancien. Il se compose des mots *mikros* et *skopein* signifiant respectivement « petit » et « examiner ». Étymologiquement, la microscopie désigne donc l'observation d'objets invisibles à l'œil nu. La microscopie regroupe les méthodes permettant à l'aide d'un microscope de faire des images agrandies d'objets trop petits pour être observés directement à l'œil nu.

Il existe différentes familles de microscopie qui se distinguent par la nature de la sonde utilisée. La microscopie optique, en opposition à la microscopie électronique qui sonde l'objet à observer par un faisceau d'électrons, utilise les ondes électromagnétiques du domaine visible au proche infrarouge. L'objet à observer est éclairé par de la lumière et l'image agrandie de cet objet est produite, par l'association de plusieurs lentilles, sur un détecteur (œil, caméra, film photographique ...). Les échantillons biologiques (étant pour la plupart partiellement transparents) peuvent être observés en réflexion ou en transmission à l'aide d'une source de lumière blanche mais également par la fluorescence grâce à un marquage spécifique des échantillons.

Pour obtenir des images de bonnes qualités, il est fondamental d'avoir un bon contraste. Le contraste indique le degré d'interaction de la lumière avec l'objet observé. Il existe différentes sources de contraste, chacune adaptée à différents types d'échantillons et donnent lieu à différentes techniques de microscopie dans diverses configurations. Parmi elles nous pouvons citer l'absorption [42] qui consiste à faire passer la lumière au travers de l'objet et mesurer la variation d'intensité induite par l'absorption. L'intensité transmise I_T de la lumière au travers d'un milieu peut être décrite par une loi de Beer-Lambert (décroissance exponentielle)

$$I_T = I_0 e^{-\mu z} \quad (0.1)$$

avec μ le coefficient d'absorption et z l'épaisseur de l'objet traversé. Cette méthode est adaptée pour les échantillons épais et/ou absorbants, ce qui n'est pas le cas des échantillons biologiques, pour la plupart transparents. Une autre source de contraste possible est l'indice optique de l'objet n . Le coefficient de réflexion R en incidence normale sur une surface étant donné par :

$$R = \left(\frac{n - n_{inc}}{n + n_{inc}} \right)^2 \quad (0.2)$$

où n_{inc} est l'indice du milieu incident. Dans le cas d'échantillons biologiques, l'indice optique des structures cellulaires est très proche de celui du milieu environnant, elles sont donc difficiles à observer. Pour ce types d'échantillons, il existe des méthodes exploitant le déphasage induit par la présence de l'objet, comme l'holographie [113], la microscopie à contraste interférentiel [116, 37], la tomographie de diffraction [95, 69] ou l'utilisation de cameras de phase [106].

L'objectif de ce travail de thèse est de présenter une technique d'imagerie adaptée pour la biologie cellulaire. Les méthodes classiques, en absorption ou en réflexion sont peu contrastées. Bien que les méthodes de microscopies exploitant la phase permettent d'obtenir des images mieux contrastées, elles ne donnent qu'une information structurale sur les cellules observées. Pour mieux comprendre les mécanismes intra-cellulaires, la microscopie de fluorescence est une technique particulièrement appréciée des biologistes car elle permet un marquage spécifique. Depuis le début des années 2000, les techniques de microscopies de fluorescences dites de super-résolution ont connu un essor important. Ces techniques permettent de contourner la limite de diffraction, limite physique fondamentale limitant la résolution de la microscopie optique. Nous présentons ici une méthode appelée RIM (pour *Random Illumination Microscopy*) qui consiste à enregistrer plusieurs images du même échantillon éclairer sous différents éclairagements aléatoires. Un traitement statistique des images RIM permet de faire une reconstruction de l'objet avec une résolution améliorée par deux. Le RIM a fait l'objet d'une thèse à l'Institut Fresnel [61] ainsi que plusieurs articles étudiant les aspects théoriques et numériques de la méthode [55]. Très récemment, la mise en œuvre expérimentale du RIM a pu être démontrée sur des échantillons calibrés mais également sur différents types d'échantillons biologiques, fixés et vivants [71]. Bien qu'ayant démontré son pouvoir de résolution latérale et une amélioration de la résolution axiale, le RIM ne permet pas une étude approfondie de structures peu brillantes et peu contrastées au niveau des membranes cellulaires. L'objectif de cette thèse a donc été de combiner le RIM avec une autre technique de microscopie appelée TIRF (*Total Internal Reflection Fluorescence Microscopy*). Le TIRF est méthode n'améliorant pas la résolution latérale des images de microscope mais permet d'obtenir un fort sectionnement optique au niveau de la membrane cellulaire. En combinant les deux nous espérons tirer avantage des deux méthodes et ainsi de pouvoir faire de l'imagerie super-résolue et très contrastée au niveau des interfaces cellulaires.

Le plan de cette thèse est le suivant. Dans le premier chapitre nous introduirons les concepts fondamentaux de la microscopie de fluorescence, ses avantages et inconvénients, notamment en ce qui concerne la limite de résolution axiale. Seront alors

présentées quelques méthodes qui permettent d'obtenir un sectionnement optique et plus particulièrement le TIRF et ses limitations. Dans le second chapitre nous présenterons en détail le principe du RIM et l'algorithme de reconstruction d'images. Nous verrons également les différences théoriques du RIM avec le TIRF-RIM. Dans le troisième chapitre nous présenterons des résultats de simulation qui ont pour but d'illustrer les différences entre RIM et TIRF-RIM ainsi que de tester la robustesse de la méthode comparée à une autre technique de microscopie concurrente. Enfin dans le dernier chapitre nous présenterons les détails expérimentaux du microscope développé pendant ce travail de thèse ainsi que les résultats obtenus avec notre montage incluant une étude de la dynamique des podosomes sur des macrophages.

1 Sectionnement optique en microscopie de fluorescence

Sommaire

1.1	Introduction	22
1.2	Microscopie de fluorescence	23
1.2.1	Principe fonctionnement d'un microscope de fluorescence . . .	23
1.2.2	Limite de résolution en microscopie de fluorescence	25
1.2.3	Fonction de transfert optique 3D	29
1.2.4	Illustration sur données réelles	30
1.3	Méthodes de sectionnement optique en microscopie de fluorescence .	31
1.3.1	Méthodes numériques	31
1.3.2	Confinement de l'excitation	33
1.3.2.1	Méthodes de sectionnement par focalisation	33
1.3.2.2	Microscopie à feuillet de lumière	34
1.3.2.3	Microscopie en réflexion totale interne	35
1.4	Principe du TIRF	36
1.4.1	Réflexion totale et ondes évanescentes	36
1.4.2	Performances et limitations du TIRF	40
1.5	Microscopie super-résolue en configuration TIRF	44
1.5.1	Microscopie à illumination structurée	44
1.5.2	Microscopie par détection de molécules uniques	49
1.5.3	Microscopie STED	52
1.6	Conclusion	52

1.1 Introduction

Ce premier chapitre a pour objectif d'expliquer au lecteur les fondamentaux de la microscopie de fluorescence, son intérêt pour la biologie et ses limites. Ensuite nous ferons un tour d'horizon des méthodes existantes pour obtenir un sectionnement optique et plus particulièrement la microscopie en réflexion totale interne (TIRF), configuration pour laquelle nous avons adapté le RIM. Enfin nous donnerons un aperçu des techniques de microscopie super résolues qui ont déjà été adaptées à la configuration TIRF afin de mieux comprendre par la suite l'intérêt du TIRF-RIM.

1.2 Microscopie de fluorescence

1.2.1 Principe fonctionnement d'un microscope de fluorescence

La microscopie de fluorescence est une technique qui s'est particulièrement développée au cours de ces 50 dernières années [115]. La fluorescence est un phénomène physico-chimique découvert en 1852 par Sir George G. Stokes [98] qui décrit la capacité qu'ont certains matériaux à émettre de la lumière lorsqu'ils sont excités par une source lumineuse. La microscopie de fluorescence repose donc sur l'utilisation d'une particule/substance chimique appelée fluorophore. Le fluorophore est une molécule chimique capable d'émettre un photon par émission spontanée après l'excitation d'un électron par l'absorption d'un photon. Le processus de fluorescence est décrit par le diagramme de Jablonski Figure 1.1. Un photon d'énergie $h\nu_{abs}$, de longueur d'onde λ_{abs} , est absorbé par le fluorophore. Un électron passe alors de l'état singulet S_0 à l'état S_1 ou S_2 . Une partie des électrons se désexcite de manière non-radiative de l'état S_1 à S_0 . Une autre partie se relaxe de l'état S_2 à S_1 par conversion interne. Enfin, il y a désexcitation radiative de l'état S_1 à S_0 par émission d'un photon d'énergie $h\nu_{flu}$, de longueur d'onde $\lambda_{flu} > \lambda_{abs}$. Ce décalage entre la longueur d'onde d'absorption et d'émission s'appelle le décalage de Stokes (*Stokes shift* en anglais). La microscopie de fluorescence exploite le décalage de Stokes pour obtenir des images très contrastées en séparant la lumière d'excitation de celle émise par l'échantillon étudié. Ce qui n'est pas le cas des techniques sans marquage.

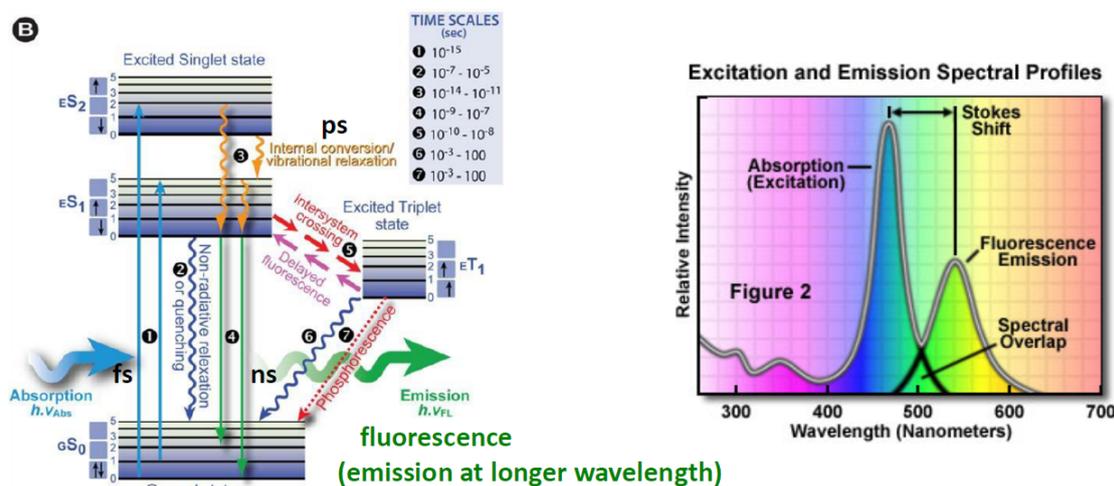


FIGURE 1.1 – Diagramme de Jablonski et spectre de fluorescence

La microscopie de fluorescence est un outil devenu indispensable en biologie cellulaire depuis la découverte des GFP *Green Fluorescent Protein* en 1962 par Osamu Shimomura. Le prix Nobel de chimie lui sera attribué en 2008 pour cette découverte. Contrairement à la fluorescéine, les GFP ne sont pas photo-toxiques [115], elles

peuvent donc être utilisées sur des cellules vivantes [18]. Les GFP ont l'avantage de pouvoir être accrochées spécifiquement à une protéine d'intérêt. Cela permet alors de faire de l'imagerie fonctionnelle, avec un très bon contraste. Aujourd'hui, il existe une grande variété de protéines fluorescentes (*YFP*, *mBanana*, *mTomato*, *mCherry* ...) couvrant tout le spectre du visible. Grâce à la spécificité du marquage et un choix de filtres appropriés, il est également possible de marquer différentes structures de la cellule. De cette manière, il est possible d'observer simultanément différents types de structures au sein d'une même cellule et donc de mieux comprendre les interactions qu'elles ont entre elles [11].

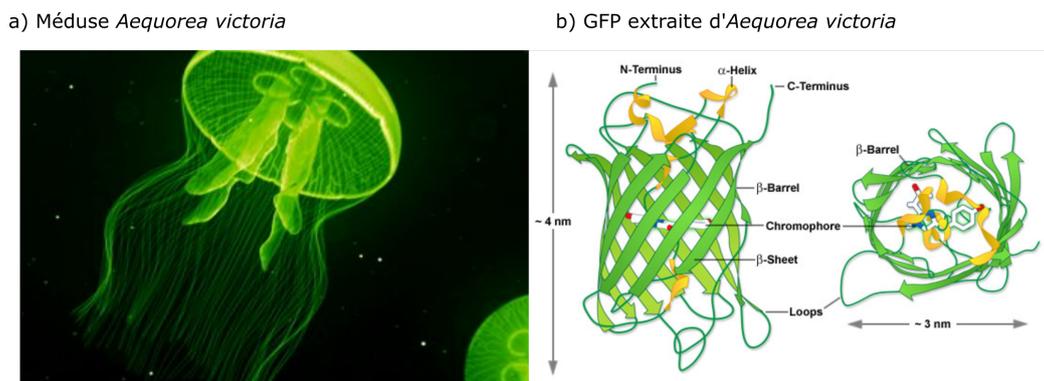


FIGURE 1.2 – Méduse *Aequorea victoria* dont a été extraite la première GFP et la protéine correspondante.

Le principe de fonctionnement d'un microscope de fluorescence est représenté Figure 1.3. La cellule à observer est placée au niveau du plan focal de l'objectif de microscope (plan focal objet). La cellule est éclairée uniformément par une source de lumière monochromatique. Cette source peut être une source de lumière blanche ou polychromatique, que l'on fait passer au travers d'un filtre d'excitation, conçu pour ne laisser passer uniquement que la longueur d'onde que peuvent absorber les fluorophores. L'intensité de fluorescence étant proportionnelle à l'intensité d'excitation, l'utilisation des lasers, beaucoup plus intenses et monochromatiques, est aujourd'hui majoritairement utilisée pour la microscopie de fluorescence. La lumière d'excitation est ensuite dirigée vers l'échantillon par un miroir dichroïque (réfléchissant à la longueur d'onde d'excitation). Les fluorophores accrochés dans la cellule sont excités et rayonnent à la longueur d'onde d'émission. La lumière émise est collectée par l'objectif de microscope puis transmise par le miroir dichroïque (transparent à la longueur d'onde d'émission). L'image se forme enfin sur la caméra, au niveau du plan focal image. Un filtre d'émission est ajouté pour laisser passer uniquement la fluorescence de l'échantillon et non de la lumière parasite.

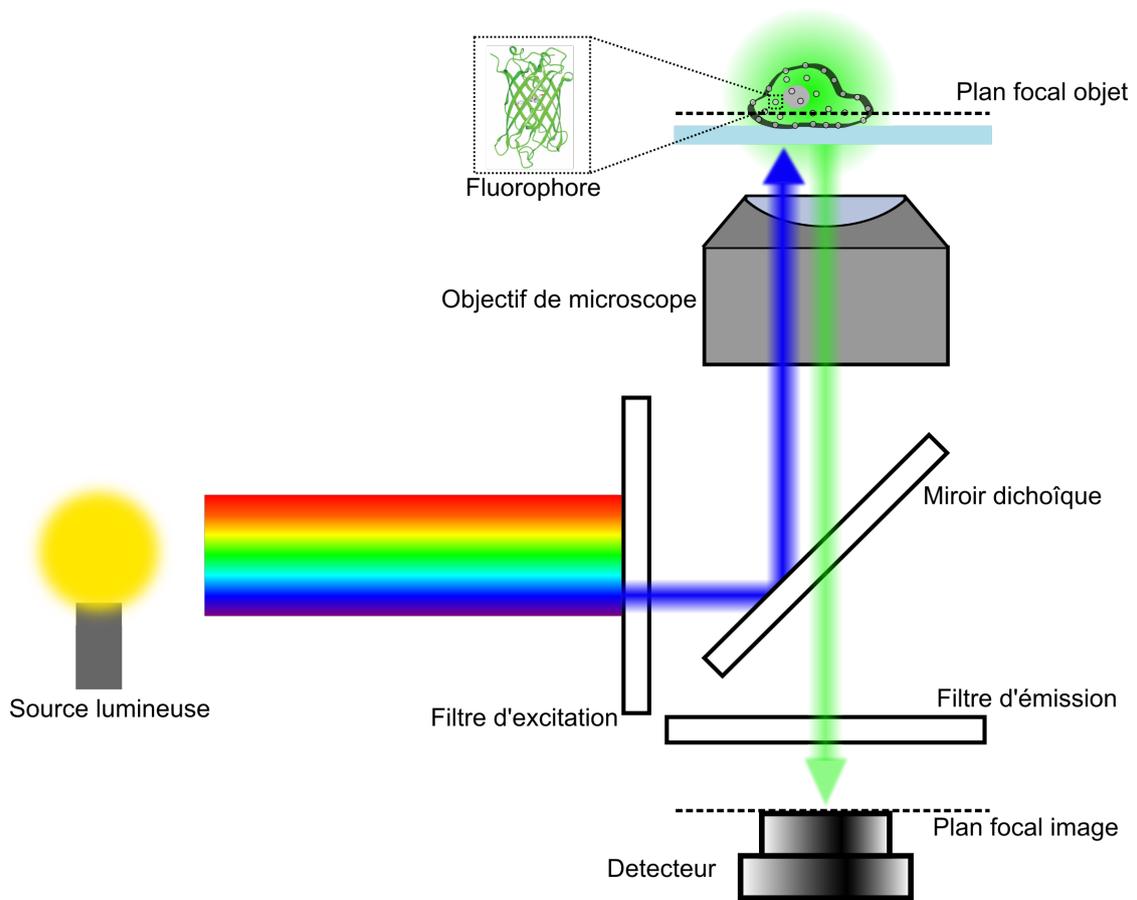


FIGURE 1.3 – Principe de la microscopie en épi-fluorescence. Une source lumineuse monochromatique (une diode laser ou une source de lumière blanche passant au travers d'un filtre d'excitation) est dirigée vers l'échantillon à observer. Les fluorophores fixés sur les structures d'intérêt absorbent la lumière puis émettent un rayonnement de fluorescence à une longueur d'onde supérieure à l'excitation. La fluorescence est collectée par l'objectif de microscope puis détectée sur le détecteur.

1.2.2 Limite de résolution en microscopie de fluorescence

Les performances d'un microscope en champ lointain sont principalement données par son grossissement et son pouvoir de résolution, distance minimale en dessous de laquelle deux objets ne sont plus discernables. La limite de résolution d'un système d'imagerie vient du caractère ondulatoire de la lumière, comme toute onde la lumière est soumise au phénomène de diffraction. La pupille d'un système d'imagerie est la plus petite ouverture par laquelle passe la lumière, pour un microscope il s'agit de l'ouverture de l'objectif qui est circulaire. L'intensité lumineuse observée en champ lointain (approximation de Fraunhofer) résultante d'une source lumineuse ponctuelle diffractée au travers d'une ouverture circulaire est une tache d'Airy [38], comme

représentée Figure 1.4.

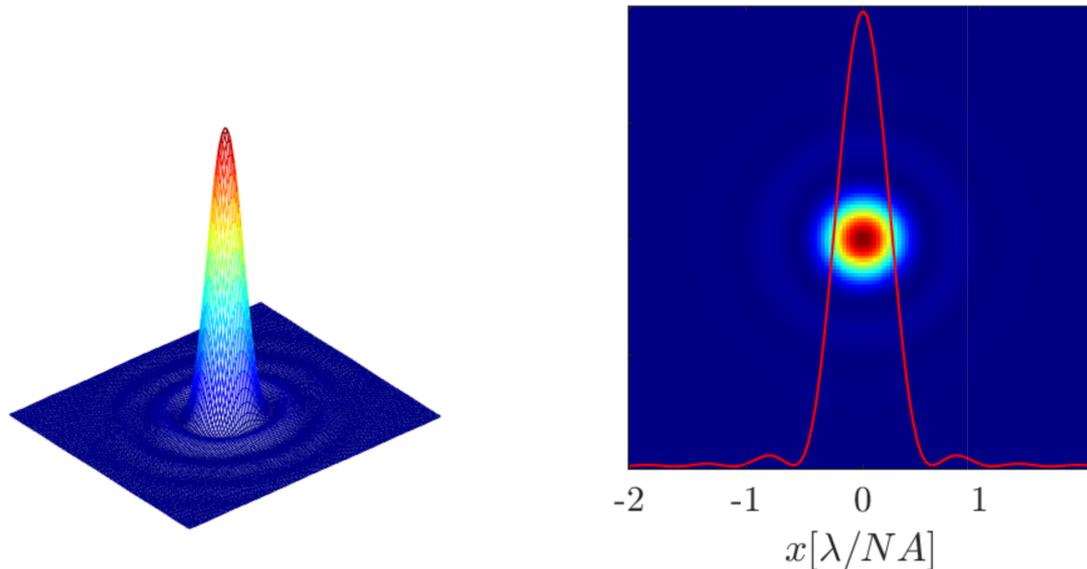


FIGURE 1.4 – Fonction d’Airy. C’est une fonction qui s’écrit en fonction d’une fonction de Bessel à symétrie radiale présentant un lobe principal et des lobes secondaires. Le premier zéro de la fonction d’Airy se trouve à $\frac{0.61\lambda}{NA}$ et définit la limite de résolution selon le critère de Rayleigh.

La résolution d’un microscope est alors (selon le critère de Rayleigh) la distance Δ entre deux points pour laquelle le maximum d’intensité de la tache d’Airy du premier point se superpose au premier minimum d’intensité de la tache d’Airy du second et vaut :

$$\Delta = \frac{0.61\lambda}{NA} \quad (1.1)$$

où $NA = n \sin\theta$ est l’ouverture numérique de l’objectif, avec n l’indice du liquide d’immersion entre l’objectif et l’échantillon et θ l’angle du rayon lumineux le plus écarté de l’axe optique collecté par l’objectif. Aujourd’hui il est courant de trouver dans le commerce des objectifs de microscopes (à immersion à huile d’indice $n=1.51$) avec une ouverture numérique de 1.4, soit une résolution $\Delta = 230nm$ à $\lambda = 532nm$ lorsque le système n’est limité que par la diffraction (pas d’aberrations).

La tache d’Airy résultante image d’une source ponctuelle est la réponse impulsionnelle du système optique (sans aberrations) ou fonction d’étalement du point, communément appelée PSF (*Point Spread Function*). La PSF que l’on notera $H(r)$ s’écrit dans le plan du détecteur

$$H(r) = \left| 2 \frac{J_1(k_0 r \text{NA})}{k_0 r \text{NA}} \right|^2 \quad (1.2)$$

avec $r = |\mathbf{r}|$, \mathbf{r} étant le vecteur position contenu dans le plan de l'image, J_1 la fonction de Bessel de première espèce d'ordre 1, NA l'ouverture numérique du système optique et $k_0 = \frac{2\pi}{\lambda}$, λ étant la longueur d'onde émise par l'objet dans le vide.

Un modèle simple de microscope a été proposé par Streibl [100] en 1985 et est représenté Figure 1.5. Il se compose de deux lentilles, la lentille de l'objectif L_O et une lentille de tube L_T . La lentille de l'objectif fait l'image agrandie du spécimen à observer situé dans le plan focal objet. Cette image est renvoyée à l'infini, les rayons lumineux provenant d'un point source ressortent parallèles entre eux. La lentille de tube forme ensuite l'image du spécimen sur la caméra située dans son plan focal image. Pour simplifier la représentation Figure 1.5, le grandissement global du microscope est ici de 1. Le plan de Fourier se situe à la fois dans le plan focal image de l'objectif et dans le plan focal objet de la lentille de tube. Dans le plan de Fourier se trouve la fonction pupille de l'objectif que l'on notera $\tilde{h}(\mathbf{k})$. Pour un objectif sans aberrations, c'est une fonction réelle d'amplitude 1 à l'intérieur d'un disque de rayon $k_0 \text{NA}$ et 0 ailleurs. Cette limite correspond à l'angle le plus élevé θ que peut collecter l'objectif qui définit l'ouverture numérique.

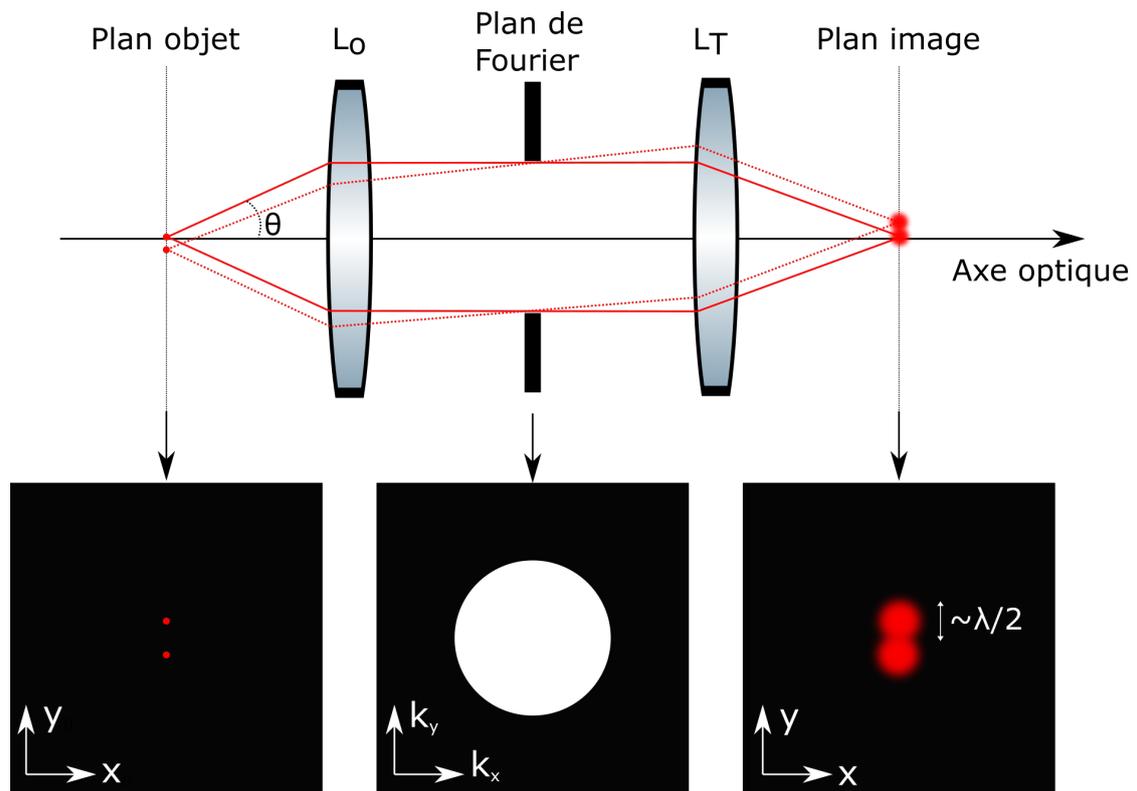


FIGURE 1.5 – Modèle simplifié d'un microscope optique proposée par Streibl [100].

L'émission d'un photon par un fluorophore étant aléatoire, la phase du champ électrique rayonné en chaque point de l'objet est décorrélée, la lumière émise par l'objet est donc incohérente. Par conséquent, l'intensité totale détectée dans le plan focal image sera la somme des intensités résultantes de chacun des points de l'objet. Autrement dit, l'image obtenue est la somme des images de chaque points. Si l'intensité lumineuse dans le plan de l'objet $I_0(\mathbf{r}')$ alors l'intensité de fluorescence dans le plan image s'écrit :

$$I(\mathbf{r}) = \int I_0(\mathbf{r}') H(\mathbf{r}-\mathbf{r}') d\mathbf{r}' \quad (1.3)$$

où $I_0(\mathbf{r}') = \rho(\mathbf{r}')E$ où ρ est la densité de fluorophores et E l'intensité l'éclairement. Cette opération est un produit de convolution entre l'intensité objet et la PSF, $H(\mathbf{r})$, que l'on note :

$$I(\mathbf{r}) = (I_0 * H)(\mathbf{r}) \quad (1.4)$$

Ceci traduit le fait que le microscope est un système linéaire et invariant. La réponse du microscope par rapport à la fluorescence d'entrée est la même quelle que soit la position du fluorophore observé.

1.2.3 Fonction de transfert optique 3D

Une source ponctuelle située dans le plan focal de l'objectif génère une onde sphérique. Une onde sphérique peut se décomposer comme la superposition continue d'ondes planes se dirigeant dans toutes les directions de l'espace. Chacune de ces ondes planes possède un vecteur d'onde $\boldsymbol{\kappa}$ de norme $k = nk_0$, n étant l'indice du milieu dans lequel se trouve la source. Dans un microscope parfait, toutes les ondes planes issues de la source seraient re-focalisées dans le plan image. Or nous avons vu dans la section précédente qu'en conséquence de la taille finie de la lentille de l'objectif, seule une fraction de ces ondes planes sont collectées. Ceci est peut-être modélisé par la fonction pupille $\tilde{h}(\mathbf{k})$ introduite plus haut. Ainsi, l'image en 3D en champ d'une source ponctuelle peut s'écrire en ne conservant que les ondes planes transmises par l'objectif :

$$h(\mathbf{r}, z) = \int_{|\mathbf{k}| \leq k_0 \text{NA}} e^{i\mathbf{k} \cdot \mathbf{r} + i\gamma(\mathbf{k})z} d\mathbf{k} \quad (1.5)$$

où \mathbf{k} représente la composante transverse du vecteur d'onde $\boldsymbol{\kappa} = \mathbf{k} + \gamma\hat{\mathbf{z}}$ avec $\gamma = \sqrt{(nk_0)^2 - |\mathbf{k}|^2}$. À partir de $\tilde{h}(\mathbf{k})$ on peut définir dans l'espace de Fourier la fonction de transfert optique 3D en champ $\tilde{h}(\mathbf{k}, k_z)$ qui est la surface d'une portion de sphère telle que représentée Figure 1.6. La PSF en intensité du microscope $H(\mathbf{r}, z)$ est donc liée à $\tilde{h}(\mathbf{k}, k_z)$ par la relation :

$$H(\mathbf{r}, z) = \left| \int \tilde{h}(\mathbf{k}, k_z) e^{i\mathbf{k} \cdot \mathbf{r} + ik_z z} d\mathbf{k} dk_z \right|^2 \quad (1.6)$$

L'équation 1.6 est la transformée de Fourier inverse 3D module au carré de $\tilde{h}(\mathbf{k}, k_z)$. La fonction de transfert optique (en intensité) $\tilde{H}(\mathbf{k}, k_z)$, définie comme étant la transformée de Fourier de $H(\mathbf{r}, z)$, est alors l'autocorrélation de $\tilde{h}(\mathbf{k}, k_z)$. Le lien entre ces différentes fonctions est résumé Figure 1.6.

Nous avons vu précédemment que l'image obtenue était le produit de convolution entre l'objet et la PSF qui peut se généraliser en trois dimensions. En utilisant le théorème de convolution, l'image dans l'espace de fréquences spatiales s'écrit :

$$\tilde{I}(\mathbf{k}, k_z) = \tilde{\rho}(\mathbf{k}, k_z) E \times \tilde{H}(\mathbf{k}, k_z) \quad (1.7)$$

Dans l'espace fréquentiel, le spectre de l'objet observé $\tilde{\rho}(\mathbf{k}, k_z)$ est directement multiplié par la fonction $\tilde{H}(\mathbf{k}, k_z)$, communément appelée OTF (*Optical Transfert Function*). En trois dimensions l'OTF a une forme de tore (voir Figure 1.6). L'OTF est une fonction avec un support limité \mathcal{D} , elle agit donc latéralement comme un filtre passe-bas. Dans le plan $(k_x, k_y, k_z = 0)$ le support est un disque de rayon $2k_0 \text{NA}$. L'OTF agit alors latéralement comme un filtre passe-bas avec une fréquence de coupure $k_c = 2k_0 \text{NA}$. Toutes les fréquences de l'objet supérieures à k_c sont alors supprimées. Ceci est vrai

pour une illumination uniforme. Nous verrons plus tard que ce n'est plus le cas avec une illumination dépendante de \mathbf{r} . Selon k_z le support \mathcal{D} est plus limité et maximum si $|\mathbf{k}| = nk_0\text{NA}$ et vaut $nk_0(1 - \cos\theta)$. La PSF est ainsi plus allongée dans la direction de l'axe optique, la résolution axiale est alors moins bonne que la résolution latérale. On remarque également que si $|\mathbf{k}| = 0$ la fréquence de coupure selon k_z est nulle. On parle donc de cône manquant *missing cone*. Cela signifie qu'il est impossible pour un microscope de fluorescence de situer la position d'un plan uniforme perpendiculaire à l'axe optique symptomatique d'un mauvais sectionnement optique. Plusieurs techniques avec des configurations diverses ont été développées au cours des dernières années pour améliorer le sectionnement optique en microscopie de fluorescence.

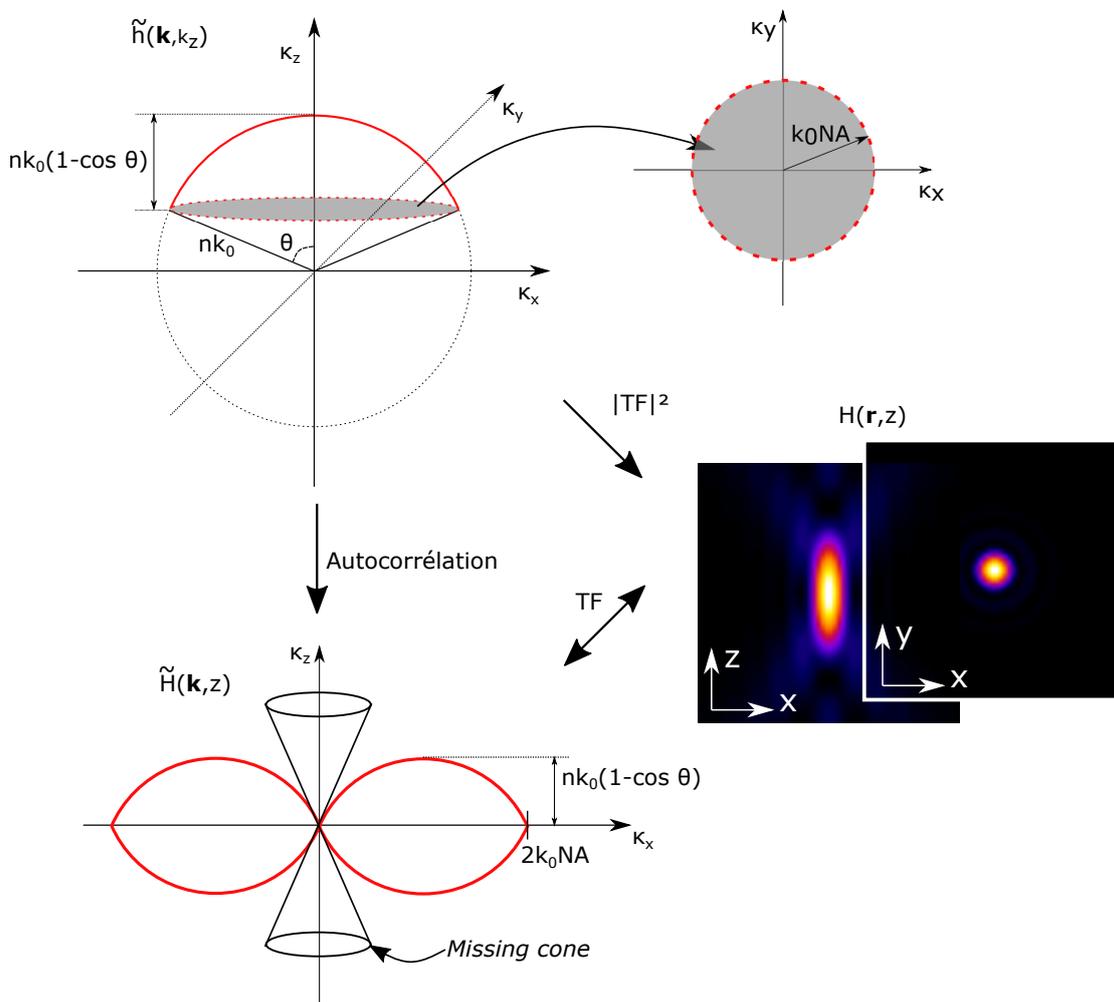


FIGURE 1.6 – Fonction de Transfert Optique du microscope

1.2.4 Illustration sur données réelles

Dans la section précédente, nous avons présenté les principes généraux de la microscopie de fluorescence ainsi que son intérêt en biologie. Cela permet d'obtenir

des images très contrastées et fonctionnelles de structures difficiles à observer en microscopie conventionnelle. Étant donné la configuration en épi-fluorescence, les fluorophores situés dans les plans supérieurs et inférieurs au plan focal de l'objectif sont excités et émettent donc la lumière. Cette lumière est également collectée par l'objectif de microscope et détectée par la caméra. Nous avons par ailleurs vu que la fluorescence est proportionnelle à la densité de fluorophores à l'intérieur de l'objet. L'observation de structures biologiques au niveau de la membrane cellulaire en microscopie de fluorescence est alors difficile, car il s'agit d'observer des objets très fins, de ce fait peu intenses. Le rapport signal à bruit est très faible à cause de la fluorescence provenant des plans hors-focus. La fluorescence hors-focus est bien visible sur l'image de cellule présentée Figure 1.7. La totalité du volume de la cellule est uniformément éclairée. La cellule est placée de sorte que le plan focal de l'objectif soit situé juste au-dessus de la lamelle. Tous les plans se trouvant au-dessus émettent de la fluorescence, une partie de cette contribution est indiquée par les cercles rouges (le flou sur les pourtours de la cellule et la zone très brillante au centre).

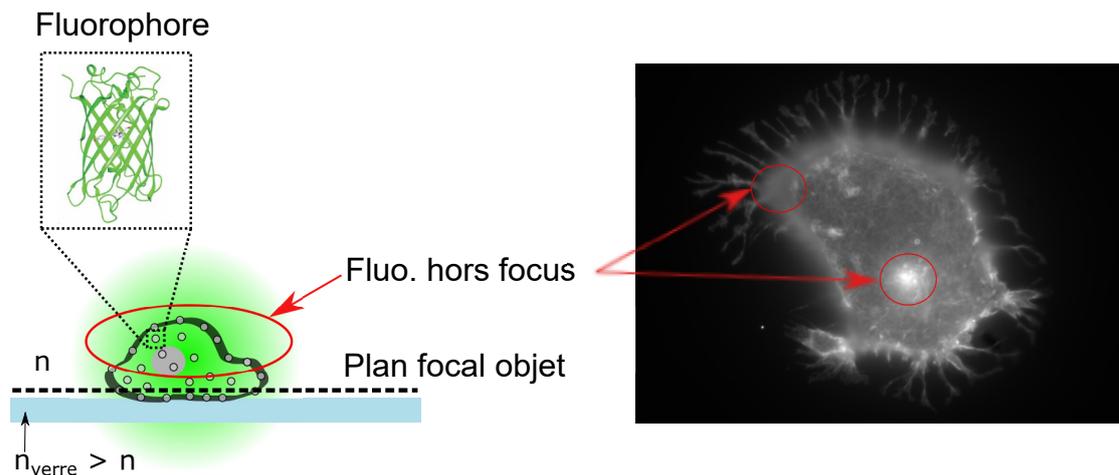


FIGURE 1.7 – Perte de contraste due à la fluorescence hors-focus

1.3 Méthodes de sectionnement optique en microscopie de fluorescence

1.3.1 Méthodes numériques

Une méthode pour améliorer le sectionnement optique et donc la résolution axiale des images de fluorescence consiste à faire une déconvolution numérique. Nous avons vu que mathématiquement la formation d'une image consiste à multiplier le spectre de l'objet par l'OTF du microscope. La déconvolution a pour but d'inverser l'équation 1.7 pour rehausser les fréquences dans toutes les directions de l'espace atténuées par l'OTF. Si la PSF H est connue expérimentalement ou peut être approximée théori-

quement, il est possible de trouver une estimation ρ_0 de l'objet ρ en minimisant la fonction coût \mathcal{F} :

$$\mathcal{F}(\rho_0) = \|H * \rho_0 - \rho\|^2 \quad (1.8)$$

La méthode la plus directe consiste à faire une inversion dite "naïve" dans l'espace de Fourier. Cette méthode d'inversion n'est cependant pas possible, car l'OTF tendant vers 0 a pour conséquence d'amplifier le bruit des hautes fréquences. Pour parer à cela il est possible d'ajouter un terme de régularisation à la fonction coût pour atténuer l'amplification du bruit. La déconvolution de Wiener [108] et la régularisation de Tikhonov [103] en sont des exemples, ce sont des méthodes directes simples d'inversions nécessitant l'ajustement d'un seul paramètre. Il existe également des méthodes d'inversions qui minimisent la fonction coût de manière itérative par descente de gradient telles que [65, 89, 68]. Ces méthodes se différencient par des hypothèses sur la nature du bruit ou de l'objet à reconstruire. Elles ont l'inconvénient d'être vulnérables à de l'*over-fitting* si le nombre d'itérations est trop grand.

Il est également possible d'utiliser une illumination structurée pour supprimer la fluorescence hors-focus. Une possibilité consiste à imager une grille d'illumination transverse dans le plan objet. En faisant trois images en décalant la grille de lumière d'un tiers de sa période, on obtient trois images où c'est essentiellement l'information sur le plan d'observation qui est modulée. La fluorescence hors-focus étant peu affectée par la modulation, en soustrayant deux-à-deux les images seule l'information hors-focus est supprimée. Nous reviendrons sur l'illumination structurée et sa capacité à améliorer la résolution axiale dans la section 1.5.1. En 2005 Mertz propose une méthode appelée DSI (*Dynamic Speckle Illumination*) [104] et a démontré qu'il était possible d'obtenir un sectionnement optique en utilisant une illumination structurée aléatoire. Pour cela un diffuseur est placé sur le chemin de l'illumination pour créer un speckle dans le plan de l'objet. Avec 50 à 100 images enregistrées avec différentes illuminations de speckles il est possible d'obtenir un sectionnement axial.

1.3.2 Confinement de l'excitation

1.3.2.1 Méthodes de sectionnement par focalisation

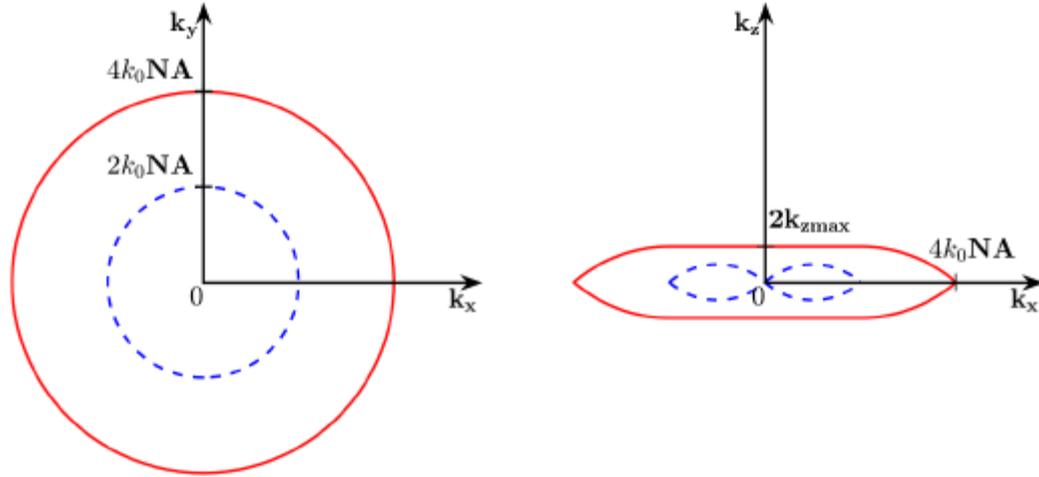


FIGURE 1.8 – Support de l'OTF en microscopie confocale (traits pleins rouges) comparé à celui obtenu avec une illumination uniforme (pointillés bleus). A gauche dans le plan $(\mathbf{k}_x, \mathbf{k}_y)$ et à droite dans le plan $(\mathbf{k}_x, \mathbf{k}_z)$.

En microscopie confocale, technique proposée par Minsky en 1957 [77], l'excitation n'est pas uniforme sur tout l'objet, mais est focalisée en un point. Comme pour la formation de l'image d'un point au travers d'un objectif de microscope, la focalisation de ce point est limitée par la diffraction. L'illumination prend alors la forme d'une PSF dite d'excitation $H_{exc}(\mathbf{r}, z)$. La fluorescence est ensuite collectée par l'objectif puis captée par le détecteur composé d'un seul pixel. Un filtre spatial quasi ponctuel (*pinhole*) est positionné devant le détecteur et filtre la lumière ne provenant pas du plan focal [86]. Pour obtenir une image de l'objet un balayage de la PSF d'excitation est alors effectué. La formation d'une image en microscopie confocale peut ensuite être modélisée par la convolution de l'objet avec une PSF effective que l'on note $H_{conf}(\mathbf{r}, z)$ qui est le produit des PSF d'excitation et de d'observation [110], ce qui donne :

$$I(\mathbf{r}, z) = (\rho * H_{conf})(\mathbf{r}, z) \quad (1.9)$$

avec $H_{conf}(\mathbf{r}, z) = H_{exc}(\mathbf{r}, z) \times H_{obs}(\mathbf{r}, z)$ où H_{exc} et H_{obs} sont égales à H défini dans la section 1.2.3 à la longueur d'onde d'excitation et de détection respectivement. Si on fait l'approximation raisonnable $H_{exc}(\mathbf{r}, z) = H_{obs}(\mathbf{r}, z)$, le support de $\tilde{H}_{conf}(\mathbf{k}, k_z)$ est deux fois plus grand dans le plan (k_x, k_y) et il n'y a plus de cône manquant. Cela signifie que la résolution latérale a été améliorée d'un facteur deux et qu'à l'inverse de la microscopie en épi-fluorescence, il y a un sectionnement optique. En pratique l'utilisation d'un *pinhole* devant le détecteur diminue considérablement le nombre

de photons collecté. La résolution latérale est alors sensiblement la même qu'en microscopie conventionnelle [59].

Une seconde méthode permettant d'obtenir un sectionnement optique basée sur le balayage d'un faisceau focalisé est la microscopie à deux photons [26, 101]. Lorsque l'intensité d'excitation est très élevée, la probabilité pour qu'un fluorophore dont l'énergie d'excitation est E_{exc} (de longueur d'onde associée $\lambda_{exc} = \frac{h}{E_{exc}}$, h étant la constante de Planck) absorbe deux photons d'énergie $E_{exc}/2$ n'est pas négligeable. Contrairement à la fluorescence linéaire, la longueur d'onde d'excitation est alors plus grande (environ deux fois plus) que la longueur d'onde de détection. Les régimes d'intensités nécessaires peuvent être atteints par la focalisation d'un laser dans l'échantillon. La fluorescence à deux photons n'ayant lieu que dans le volume de focalisation de l'excitation, il n'y a pas de fluorescence provenant des plans hors-focus. Comme pour la microscopie confocale, il est nécessaire de scanner l'objet avec le faisceau focalisé pour obtenir une image. L'intensité de fluorescence est proportionnelle au carré de l'intensité d'excitation et détectée sur un seul détecteur, comme pour le confocal mais sans *pinhole*. L'image se modélise alors par la relation :

$$I(\mathbf{r}, z) = (\rho * H_{2p})(\mathbf{r}, z) \quad (1.10)$$

où $H_{2p}(\mathbf{r}, z) = H_{exc}(\mathbf{r}, z)^2$. La puissance nécessaire pour l'excitation requiert généralement l'utilisation de lasers pulsés femto-seconde et l'intensité émise étant très faible les détecteurs sont généralement des photo-multiplicateurs. Cette méthode a néanmoins l'avantage de pouvoir aller très profondément dans les tissus observés [50], de l'ordre du millimètre. Cette méthode peut être étendue à de l'excitation multi-photons [51, 111].

1.3.2.2 Microscopie à feuillet de lumière

La microscopie à feuillet de lumière (*Light Sheet Microscopy*) est une méthode qui consiste à éclairer l'échantillon par un faisceau perpendiculaire à l'axe optique de l'objectif de collection. Le faisceau est focalisé dans une direction et collimaté dans l'autre. Le sectionnement optique de cette technique est limité par la diffraction. Cette méthode a été développée par Voie [105] en 1993 pour étudier des cellules de cobaye en 3D avec une résolution axiale de $26\mu m$. En 2004 Huisken atteint une résolution axiale de $6\mu m$ sur un poisson-zèbre [54]. Les meilleurs atteignent aujourd'hui une résolution de l'ordre du micromètre. La microscopie à feuillet de lumière est devenue populaire pour l'étude d'autres organismes modèles tel que la drosophile. En pratique l'éclairage est obtenu par l'association d'un second objectif et d'une lentille cylindrique. Cette méthode a l'avantage de pouvoir exciter n'importe quel plan de l'échantillon, mais ne permet qu'un sectionnement optique de l'ordre de quelques microns. La géométrie du montage est également plus complexe à mettre en œuvre et nécessite une préparation d'échantillon bien spécifique du fait d'être éclairé orthogonalement à l'axe optique de la détection [88]. Pour plus de détails le lecteur est invité

à consulter [75, 31].

1.3.2.3 Microscopie en réflexion totale interne

La microscopie TIRF (*Total Internal Reflection Fluorescence*), est une méthode qui consiste à utiliser comme source d'excitation l'onde évanescente créée par la réflexion totale de la lumière à une interface. Cette méthode permet d'exciter l'échantillon par une très fine couche de lumière, le sectionnement optique obtenu est de l'ordre de quelques centaines de nanomètres, ce qui est la profondeur de pénétration au-dessus de l'interface. L'exploitation d'une onde évanescente pour l'imagerie biologique a pour la première fois été utilisée par Ambrose en 1956 [2]. Dans cette première version, l'échantillon est déposé sur un prisme pour générer l'excitation évanescente. Dans cette configuration, l'objectif de microscope collecte la lumière évanescente convertie en onde propagative du fait de la présence de l'échantillon d'un indice supérieur à son milieu environnant, proche ou en contact avec l'interface. C'est donc une technique sans marquage fluorescent. C'est Axelrod qui l'adapta ensuite en 1981, à la microscopie de fluorescence [3, 4]. La microscopie TIRF est devenu particulièrement populaire parce qu'elle permet d'obtenir un très bon sectionnement optique, typiquement inférieur à 200nm et ainsi d'excellents contrastes et plus particulièrement depuis l'apparition sur le marché des objectifs de microscopes à grande ouverture numérique. Les objectifs à grande ouverture numérique, en plus d'une bonne résolution latérale permettent d'éclairer l'échantillon avec un angle suffisamment grand pour atteindre la réflexion totale [99]. Il est alors possible de faire du TIRF sur un microscope standard simplement en déplaçant le faisceau au bord de la pupille de l'objectif. Le principal intérêt du TIRF comparé aux méthodes présentées précédemment est que c'est la seule méthode qui permette un sectionnement optique de seulement quelques centaines de nanomètres.

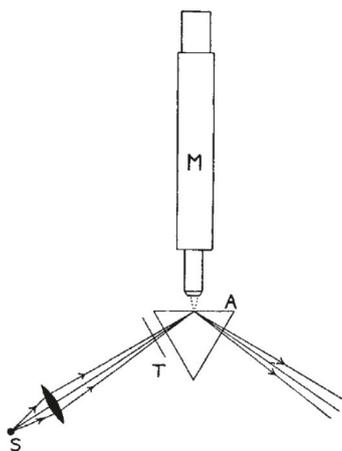


Fig. 1

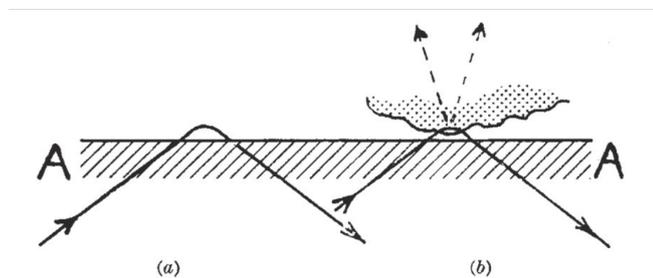


Fig. 3

FIGURE 1.9 – Réflexion totale frustrée

1.4 Principe du TIRF

1.4.1 Réflexion totale et ondes évanescentes

Pour comprendre le phénomène de réflexion totale interne et ce qu'est une onde évanescente, il est nécessaire de rappeler que la propagation des ondes électromagnétiques est régie par les quatre équations de Maxwell :

$$\begin{aligned}\operatorname{div}\mathbf{D} &= \rho_e \quad (\text{Maxwell-Gauss}) \\ \operatorname{div}\mathbf{B} &= 0 \quad (\text{Maxwell-Thomson}) \\ \operatorname{rot}\mathbf{E} &= -\frac{\partial\mathbf{B}}{\partial t} \quad (\text{Maxwell-Faraday}) \\ \operatorname{rot}\mathbf{H} &= \mathbf{J} + \frac{\partial\mathbf{D}}{\partial t} \quad (\text{Maxwell-Ampère})\end{aligned}\tag{1.11}$$

avec \mathbf{E} et \mathbf{H} respectivement les champs électrique et magnétique, \mathbf{D} et \mathbf{B} respectivement les inductions électrique et magnétique, ρ_e la densité volumique de charges électriques et \mathbf{J} la densité de courant. Dans les milieux, \mathbf{E} , \mathbf{H} , \mathbf{D} et \mathbf{B} sont liés aux quantités macroscopiques \mathbf{P} et \mathbf{M} , la polarisation électrique et l'aimantation respectivement, par les relations :

$$\begin{aligned}\mathbf{D} &= \epsilon_0\mathbf{E} + \mathbf{P} \\ \mathbf{B} &= \mu_0(\mathbf{H} + \mathbf{M})\end{aligned}\tag{1.12}$$

où ϵ_0 et μ_0 sont respectivement les permittivité et perméabilité du vide. Lorsque l'on étudie la réflexion d'une onde électromagnétique sur une interface, il est commode de décomposer les champs selon des composantes définies par la géométrie du plan de l'interface. On appelle composante transverse électrique (TE) la composante du champ électrique parallèle à l'interface et composante transverse magnétique (TM) celle contenue dans plan d'incidence comme indiqué sur la Figure 1.10. Si l'on considère qu'aucune source n'est présente ($\rho_e = 0$ et $\mathbf{J} = 0$) nous obtenons les équations de continuité suivantes :

$$\begin{aligned}(\mathbf{E}_2 - \mathbf{E}_1) \times \mathbf{e}_z &= 0 \\ (\mathbf{H}_2 - \mathbf{H}_1) \times \mathbf{e}_z &= 0 \\ (\mathbf{D}_2 - \mathbf{D}_1) \cdot \mathbf{e}_z &= 0 \\ (\mathbf{B}_2 - \mathbf{B}_1) \cdot \mathbf{e}_z &= 0\end{aligned}\tag{1.13}$$

En utilisant ces équations de continuité, on trouve les relations entre l'amplitude des ondes transmise et réfléchi appelées coefficients de Fresnel. Pour une onde polarisée TE avec une incidence θ_i par rapport à la normale, les coefficients r_{TE} et t_{TE} sont donnés par :

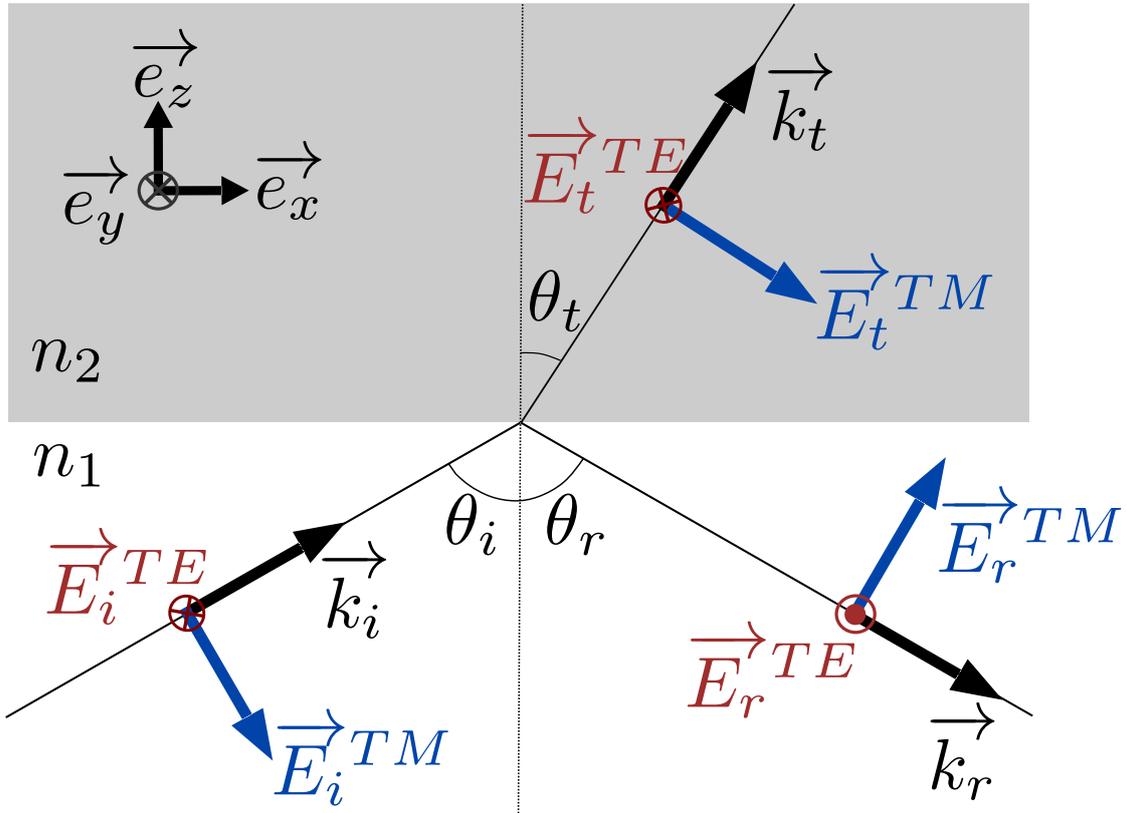


FIGURE 1.10 – Définition des composantes *TE* et *TM* lors de la réflexion d'une onde électromagnétique à une interface définie par les milieux d'indices n_1 et n_2 .

$$r_{TE} = \frac{E_r^{TE}}{E_i^{TE}} = \frac{n_1 \cos(\theta_i) - \sqrt{n_2^2 - n_1^2 \sin^2(\theta_i)}}{n_1 \cos(\theta_i) + \sqrt{n_2^2 - n_1^2 \sin^2(\theta_i)}} \quad (1.14)$$

$$t_{TE} = \frac{E_r^{TM}}{E_i^{TM}} = \frac{2n_1 \cos(\theta_i)}{n_1 \cos(\theta_i) + \sqrt{n_2^2 - n_1^2 \sin^2(\theta_i)}} \quad (1.15)$$

Et pour une onde polarisée *TM* :

$$r_{TM} = \frac{E_t^{TE}}{E_i^{TE}} = \frac{-n_2 \cos(\theta_i) + \frac{n_1}{n_2} \sqrt{n_2^2 - n_1^2 \sin^2(\theta_i)}}{n_2 \cos(\theta_i) + \frac{n_1}{n_2} \sqrt{n_2^2 - n_1^2 \sin^2(\theta_i)}} \quad (1.16)$$

$$t_{TM} = \frac{E_t^{TM}}{E_i^{TM}} = \frac{2n_1 \cos(\theta_i)}{n_2 \cos(\theta_i) + \frac{n_1}{n_2} \sqrt{n_2^2 - n_1^2 \sin^2(\theta_i)}}$$

On peut voir que lorsque $n_1 > n_2$, il existe un angle $\theta_c = \arcsin \frac{n_2}{n_1}$ pour lequel le terme $n_2^2 - n_1^2 \sin^2(\theta_i) < 0$. Pour $\theta_i > \theta_c$ les coefficients de réflexions peuvent se réécrire :

$$r_{TE} = \frac{n_1 \cos(\theta_i) - i \sqrt{n_1^2 \sin^2(\theta_i) - n_2^2}}{n_1 \cos(\theta_i) + i \sqrt{n_1^2 \sin^2(\theta_i) - n_2^2}} = 1. e^{j\varphi_{TE}}$$

$$r_{TM} = \frac{-n_1 \cos(\theta_i) + i \frac{n_1}{n_2} \sqrt{n_1^2 \sin^2(\theta_i) - n_2^2}}{n_1 \cos(\theta_i) + i \frac{n_1}{n_2} \sqrt{n_1^2 \sin^2(\theta_i) - n_2^2}} = 1. e^{j\varphi_{TM}}$$
(1.17)

Pour un angle d'incidence $\theta_i > \theta_c$ le module du coefficient de réflexion est égal à 1 et l'onde est entièrement réfléchi. Le terme de phase $\varphi_{TE/TM}$ indique que l'onde réfléchi est déphasée par rapport à l'onde incidente. Ce déphase est responsable du phénomène connu sous le nom de décalage de Goos-Hänchen [40] qui se manifeste par le déplacement du rayon réfléchi d'une distance ξ^1 par rapport point d'impact du rayon incident (pour un faisceau de taille fini). L'étude des coefficients de Fresnel permet de comprendre la réflexion totale. Intéressons-nous maintenant à l'origine du champ évanescent.

L'onde incidente \mathbf{E}_i dans le milieu d'indice n_1 a un vecteur d'onde \mathbf{k}_i . L'onde transmise \mathbf{E}_t dans le milieu d'indice n_2 a un vecteur d'onde \mathbf{k}_t . Les vecteurs d'ondes peuvent être décomposés en leurs composantes tangentielles \mathbf{k}_\parallel et longitudinales \mathbf{k}_z comme indiqué Figure 1.11. On a donc les relations :

$$\mathbf{k}_i = \mathbf{k}_\parallel^i + \mathbf{k}_z^i \quad (1.18)$$

$$\mathbf{k}_t = \mathbf{k}_\parallel^t + \mathbf{k}_z^t \quad (1.19)$$

Ensuite, par continuité des composantes tangentielles :

$$|\mathbf{k}_\parallel^t| = |\mathbf{k}_\parallel^i| = n_1 k_0 \sin \theta_i \quad (1.20)$$

Où $k_0 = \frac{2\pi}{\lambda}$ est la norme du vecteur d'onde dans le vide. Enfin, par construction :

$$|\mathbf{k}_z^t|^2 = |\mathbf{k}_t|^2 - |\mathbf{k}_\parallel^t|^2 = n_2^2 k_0^2 - n_1^2 k_0^2 \sin^2 \theta_i \quad (1.21)$$

Finalement, la composante longitudinale du vecteur d'onde transmis est :

$$|\mathbf{k}_z^t| = k_0 \sqrt{n_2^2 - n_1^2 \sin^2 \theta_i} \quad (1.22)$$

1. $\xi_{TE} = \left(\frac{2}{k_1}\right) \frac{\tan \theta_c}{\sqrt{(\sin^2 \theta_i - \sin^2 \theta_c)}}$ et $\xi_{TM} = \xi_{TE} / \sin^2 \theta_c$ où $k_1 = \frac{2\pi n_1}{\lambda}$

Comme $n_1 > n_2$, si $\theta_i > \theta_c$ l'argument sous la racine est négatif. Alors $|\mathbf{k}_z^t|$ est imaginaire pur et se réécrit sous la forme :

$$|\mathbf{k}_z^t| = i\delta \quad \text{avec} \quad \delta = k_0 \sqrt{n_1^2 \sin^2 \theta_i - n_2^2} \quad (1.23)$$

L'expression du champ transmis dans le milieu d'indice n_2 est alors :

$$\mathbf{E}_t = e^{i\mathbf{k}_t \cdot \mathbf{r}} = \mathbf{E}_{t0} e^{i(k_x^t x + k_y^t y)} e^{-\delta z} \quad (1.24)$$

où $\mathbf{E}_{t0} = t\mathbf{E}(z=0)$ est le champ transmis au niveau de l'interface. Il est important de noter que pour $\theta_i = \theta_c$, à l'interface, il y a une sur-intensification du champ électrique. En $z=0$ le rapport entre le champ transmis et incident est égal au coefficient de Fresnel qui, pour une interface verre-air, vaut 2 pour une polarisation TE et 3 pour une polarisation TM , soit une multiplication de l'intensité incidente d'un facteur 4 ou 9. Bien entendu, même si le champ existe dans le milieu 2, par conservation de l'énergie, l'énergie ne se propage pas dans le milieu 2. On peut le vérifier en étudiant le vecteur de Poynting (moyenné dans le temps) qui est défini par :

$$\langle \mathbf{P} \rangle = \frac{1}{2} \mathcal{R}(\mathbf{E} \times \mathbf{H}^*) \quad (1.25)$$

où \mathcal{R} indique que l'on prend la partie réelle. En utilisant les équations de Maxwell 1.11 on peut exprimer le champ magnétique \mathbf{H} en fonction de \mathbf{E} tel que

$$\mathbf{H} = \mathbf{k} \times \mathbf{E} \quad (1.26)$$

et facilement vérifier que le flux au travers d'une surface parallèle à l'interface est nul. En revanche on peut montrer [80] que pour une onde incidente selon la direction \mathbf{e}_x , la composante $\langle \mathbf{P} \rangle_x$ est non-nulle et vaut :

$$\langle \mathbf{P} \rangle_x = \frac{1}{2} \sin \theta_i \left(|t_{TE}|^2 |\mathbf{E}_{TE}|^2 + |t_{TM}|^2 |\mathbf{E}_{TM}|^2 \right) e^{-2\delta z} \quad (1.27)$$

Les vecteurs sont ici définis dans le milieu 2, mais nous avons supprimé les indices pour simplifier la notation. Cela signifie que l'onde évanescente transporte de l'énergie le long de l'interface dans le milieu 2 selon la direction incidente, mais qu'elle reste axialement confinée.

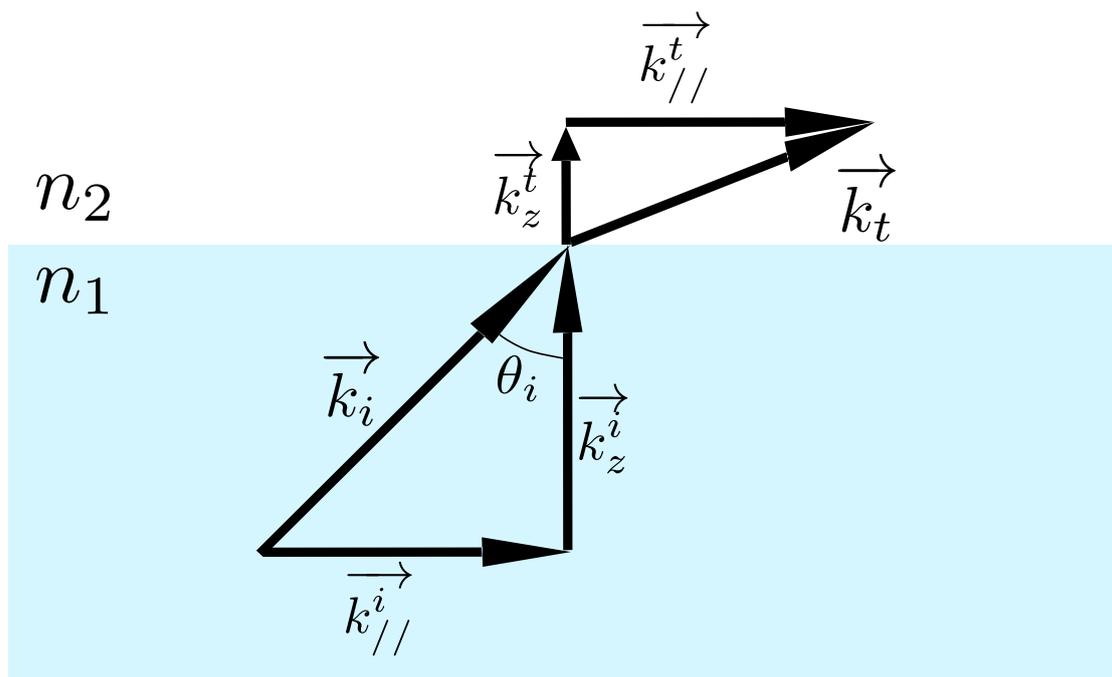


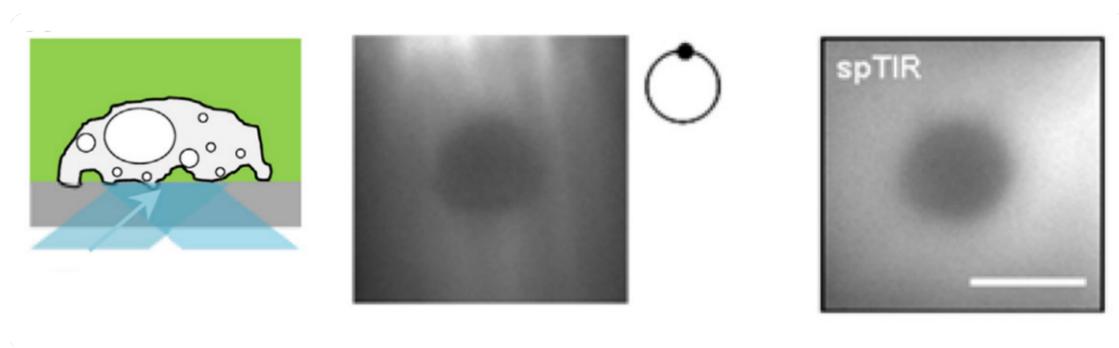
FIGURE 1.11 – Décomposition des vecteurs d’ondes incidents et transmis à l’interface définie par les milieux d’indices n_1 et n_2 en leurs composantes longitudinales et transverses

À l’interface, on observe donc un champ dont l’amplitude décroît exponentiellement qui a une profondeur de pénétration de l’ordre de λ , soit quelques centaines de nanomètres. Il est donc possible dans cette configuration d’exciter seulement une fine épaisseur de l’échantillon et donc de s’affranchir du signal ne provenant pas du plan focal.

1.4.2 Performances et limitations du TIRF

Le TIRF, comme pour la configuration en épi-fluorescence, a une résolution latérale limitée par la diffraction. Soit 200 nm environ avec les meilleurs objectifs d’ouverture numérique 1.49. Ensuite n’étant pas en incidence normale, la direction de l’illumination incidente peut avoir un impact sur l’uniformité de l’excitation. Ceci a été démontré par Oheim [15], Figure 1.12. Sur la Figure 1.12, on peut voir que la présence de la cellule induit une trainée dans la fluorescéine. La présence de la cellule convertie la lumière évanescente en lumière propagative, qui excite la fluorescence dans une direction privilégiée. Pour corriger cela, la méthode la plus couramment utilisée consiste à faire tourner le laser d’excitation autour de l’axe optique avec des miroirs galvanométriques. En choisissant une période de rotation égale au temps d’intégration de la caméra le problème d’uniformité peut être corrigé. Cette méthode reste néanmoins compliquée à mettre en œuvre expérimentalement, car il faut s’assurer que la rotation du faisceau soit parfaitement confiné à un anneau très fin sur la

pupille arrière de l'objectif. Ce type de microscope se trouve dans le commerce sous l'appellation TIRF-azimutale.



Brunstein et al, Biophysical Journal (2014) 1020-1032

FIGURE 1.12 – Cellule non-marquée dans de la fluorescéine. Image TIRF avec incidence dans une direction et avec illumination tournante (spTIR). Tirée de [15]

Nous venons d'évoquer l'impact de la présence d'une cellule sur la lumière évanescente. En effet, à cause de l'indice de la cellule, supérieur au milieu qui l'entoure, la condition de réflexion totale $\theta_c = \arcsin \frac{n_2}{n_1}$ que l'on a vu précédemment n'est localement plus respectée, car $n_{cell} > n_2$. Nous avons mentionné plus haut l'expérience originelle d'Ambrose avec une configuration de réflexion totale via un prisme. Dans cette expérience, c'est la lumière qui s'est propagée dans l'échantillon qui est détectée. En réalité la cellule même lorsque qu'elle n'est pas en contact direct avec l'interface peut générer des ondes non-évanescentes. Ce phénomène s'appelle la réflexion totale frustrée (FTIR). On peut montrer que le coefficient de transmission de deux dioptries définies par trois milieux d'indices n_1 , n_2 , et n_3 lorsque l'onde incidente est en réflexion totale à l'interface définie par n_1 et n_2 (voir Figure 1.13) n'est pas nul² mais vaut :

$$T = \frac{1}{\alpha \sinh^2 \delta + \beta} \quad (1.28)$$

avec δ proportionnel à la distance séparant les deux interfaces, α et β sont des constantes dépendantes des paramètres du problème (angle d'incidence, indices optiques, longueur d'onde et polarisation). Sur la Figure 1.13 est représenté le coefficient de transmission en fonction de l'espace d entre les milieux d'indices n_1 et n_3 en réflexion totale frustrée pour différents angles d'incidence en polarisation TE dans le cas particulier où $n_1 = n_3 = 1.51$ et $n_2 = 1.33$. On rappelle que dans cette configuration, l'angle critique à la première interface vaut 61.7° . On peut voir que

2. Cette situation est analogue de l'effet tunnel en mécanique quantique. La probabilité qu'a une particule de masse m d'énergie E de franchir une barrière d'énergie $V > E$ et de largeur d suit exactement la même loi que décrite par l'équation 1.28.

le coefficient de transmission n'est pas négligeable pour d de l'ordre de la longueur d'onde, il vaut même 20% pour $d = \lambda$ pour une angle d'incidence de 62° . Lorsque d tend vers 0 le coefficient de transmission tend vers 1 lorsque $n_1 = n_3$. Pour des structures biologiques, la plupart du temps $n_1 > n_3$, T est donc inférieur à 1 si $d = 0$. Mais pour des angles proches de l'angle critique, la condition de réflexion totale peut alors ne plus être vérifiée et la lumière d'excitation peut alors localement se propager dans les plans supérieurs. En pratique l'indice optique des structures cellulaires n'est pas aussi élevé que celui du verre ($n_{verre} = 1.51$). L'indice typique moyen d'une cellule est généralement compris entre 1.36 et 1.38 [87, 57] qui est fait quasiment l'indice optique du cytoplasme [10, 70]. Cependant, une cellule a des structures d'indices très variées [43], par exemple les membranes cellulaires, directement en contact avec la lamelle ont un indice beaucoup plus élevé, autour de 1.48-1.49 [10, 70]. Certains organites intra-cellulaires peuvent même avoir des indices bien supérieurs, comme les lysosomes et les mélanosomes d'indices respectifs 1.6 [109] et 1.8 [23].

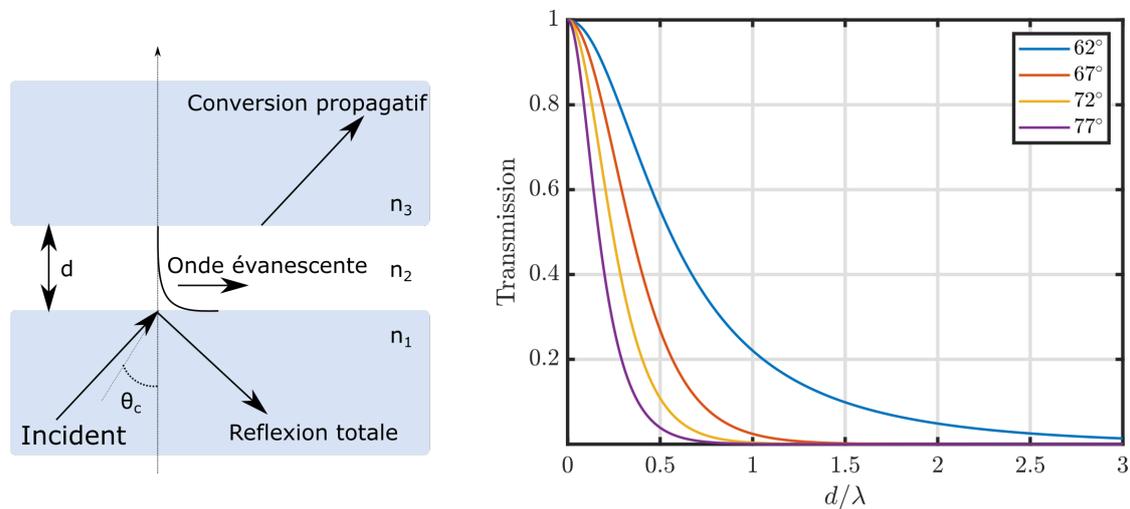


FIGURE 1.13 – Réflexion totale frustrée

Une seconde source d'excitation non-évanescence en TIRF induite par l'objet et/ou la lamelle est la diffraction de l'excitation évanescente par des structures de l'objet. Bien que le flux du vecteur de Poynting normal à la surface soit nul pour un champ évanescent, l'énergie qu'il contient n'est pas nulle et est à même d'exciter des dipôles. Ces dipôles peuvent eux rayonner un champ dont le flux normal à la surface n'est pas nul.

Il a également été reporté dans la littérature que les objectifs à haute ouverture numérique étaient une source d'excitation non-évanescence qui n'était pas négligeable. En effet, pour obtenir l'excitation TIRF, le faisceau passe à la bordure externe de l'objectif, au travers de plusieurs lentilles, où les aberrations sont connues pour être importantes [42]. À cela s'ajoute les imperfections d'alignement, poussières etc. Il a été démontré que les TIRF avec une configuration utilisant un prisme (comme dans [2, 3]) per-

mettent d'obtenir un meilleur confinement de la lumière à l'interface. Cependant, les objectifs à grande ouverture numérique restent bien plus simples d'utilisation et majoritairement préférés dans la communauté.

Différentes stratégies ont été mises en œuvres pour quantifier la proportion de ces différentes sources de lumières parasites non-évanescents. Pour estimer les fuites dues aux imperfections des optiques d'illumination, une méthode proposée par [73] est de mesurer la profondeur de pénétration de l'illumination en détectant la fluorescence d'une couche de fluorophores déposée sur des billes d'indice optique égal à leur milieu de montage (billes de verre dans une solution de glycerol). De cette manière, connaissant la géométrie de la bille et ayant supprimé les sources dues à la présence de l'objet par indice *matching*, sachant que la fluorescence est proportionnelle à l'intensité d'excitation, il est possible de mesurer l'intensité d'excitation en fonction de la distance à l'interface. Dans cette étude Axelrod estime que, à l'interface, 10% de l'intensité d'excitation est d'origine propagative. Une autre méthode pour mesurer les fuites consiste à détecter la lumière non-évanescence en détectant avec un second objectif placé en face d'objectif d'excitation. De cette façon, il est alors possible d'estimer la proportion relative entre sources dues à l'objectif et celles dues à l'échantillon. La proportion de fuites due à de la diffraction de l'échantillon dépend bien entendu de la nature de celui-ci. Oheim 2014 l'estime par la mesure avec un second objectif entre 4 et 27% pour des échantillons faiblement à fortement diffractants. Une étude théorique/numérique proposée par Axelrod [5], montre que la diffraction par l'échantillon augmente d'environ 50% la profondeur de pénétration de l'excitation évanescente.

La grande majorité des études biologiques faite en microscopie TIRF utilisent aujourd'hui un laser comme source d'excitation. La superposition des différentes excitations non-évanescents et l'utilisation d'une source de lumière cohérente fait que l'on doit également supposer que des phénomènes d'interférences doivent également être pris en compte. Pour toutes ces raisons il n'est pas concevable de connaître exactement la forme de l'illumination ce qui peut entraîner de mauvaises interprétations des images TIRF.

Malgré les problèmes présentés dans cette partie, le TIRF reste une technique largement utilisée pour l'observation de mécanismes localisés aux interfaces cellulaires. C'est une méthode simple à mettre en place avec un objectif adapté et permet d'obtenir les meilleures performances en termes de sectionnement optique ($< 200nm$) grâce au confinement de l'excitation. Néanmoins, le lecteur est averti que le TIRF à des défauts qui peuvent être corrigés, c'est ce que nous nous proposons de faire en développant le TIRF-RIM dans ce travail de thèse.

1.5 Microscopie super-résolue en configuration TIRF

Dans cette partie nous allons voir les techniques de microscopie super-résolue qui ont déjà été adaptées en configuration TIRF. Une attention particulière sera apportée à la microscopie à illumination structurée *Structured Illumination Microscopy* dans sa configuration de réflexion totale TIRF-SIM.

1.5.1 Microscopie à illumination structurée

Nous avons vu précédemment qu'un objectif de microscope ayant une résolution spatiale finie peut alors être vu dans l'espace fréquentiel comme un filtre passe-bas dont la fréquence de coupure dépend de son ouverture numérique. La microscopie SIM (*Structured Illumination Microscopy*) mise au point par Gustaffson [46] en 1999 exploite l'effet Moiré. Ce phénomène se traduit par une modulation à basses fréquences de l'image due à la superposition des hautes fréquences (détails fins) de l'échantillon avec la période d'une grille de lumière utilisée pour illuminer l'objet à observer. La connaissance du motif d'illumination et de l'image modulée permet après une inversion numérique de remonter aux hautes fréquences de l'objet précédemment inaccessibles [47]. En pratique la grille de lumière est obtenue en plaçant un réseau sur le trajet du faisceau d'illumination ou bien en utilisant un SLM (*Spatial Light Modulator*) [97]. Plusieurs images sont acquises avec plusieurs illuminations différentes, trois positions avec trois orientations différentes pour un total de neuf images, afin de remonter aux hautes fréquences de l'échantillon dans toutes les directions de l'espace (Figure 1.14). La microscopie SIM permet alors d'améliorer la résolution d'un facteur 2.

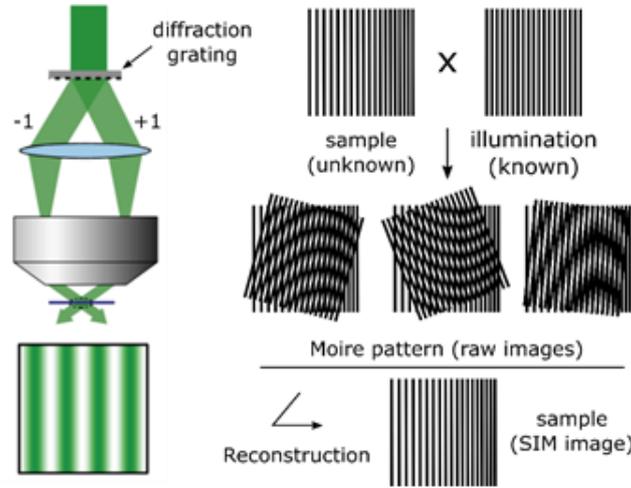


FIGURE 1.14 – Principe de la microscopie par illumination structurée. Une excitation sinusoïdale est créée en faisant interférer deux faisceaux dans le plan focal objet. La superposition de la grille de lumière sinusoïdale avec les hautes fréquences de l’objet crée un effet de Moiré (modulation basse fréquence). Dans cette modulation sont encodées les informations permettant de retrouver les hautes fréquences de l’objet. Une rotation de la grille de lumière permet alors de faire une reconstruction isotrope de l’objet.

Pour comprendre l’origine de la super-résolution en SIM, on part de l’équation 1.3 qui modélise la formation d’une image avec un éclairage homogène, mais avec une illumination sinusoïdale. Bien que généralisable en trois dimensions, pour simplifier on traite ici le cas bi-dimensionnel, \mathbf{r} et \mathbf{k}_{SIM} sont respectivement les composantes transverses du vecteur position et du vecteur d’onde de l’illumination. Nous avons alors :

$$E_{SIM}(\mathbf{r}) = 1 + \cos(\mathbf{k}_{SIM} \cdot \mathbf{r}) \quad \text{avec} \quad |\mathbf{k}_{SIM}| = \frac{2\pi n_2 \sin \theta}{\lambda} \quad (1.29)$$

où θ est l’angle d’incidence du faisceau d’excitation, n_2 l’indice optique du milieu d’immersion de l’objet et λ la longueur d’onde d’excitation. L’image est alors modélisée de la façon suivante :

$$I(\mathbf{r}) = \rho(\mathbf{r})E_{SIM}(\mathbf{r}) * H(\mathbf{r}) \quad (1.30)$$

En utilisant le théorème de convolution, on peut la réécrire dans l’espace de Fourier

$$\tilde{I}(\mathbf{k}) = (\tilde{\rho}(\mathbf{k}) * \tilde{E}_{SIM}(\mathbf{k})) \times \tilde{H}(\mathbf{k}) \quad (1.31)$$

Or la transformée de Fourier de l'illumination est la somme de trois fonctions δ de Dirac, centrées à l'origine et en $\pm \mathbf{k}_{SIM}$.

$$\tilde{E}_{SIM}(\mathbf{k}) = \delta(\mathbf{k}) + \frac{1}{2}(\delta(\mathbf{k} + \mathbf{k}_{SIM}) + \delta(\mathbf{k} - \mathbf{k}_{SIM})) \quad (1.32)$$

Ce qui donne l'expression de $\tilde{I}(\mathbf{k})$ suivante

$$\tilde{I}(\mathbf{k}) = \tilde{H}(\mathbf{k}) \left(\tilde{\rho}(\mathbf{k}) + \frac{1}{2} \tilde{\rho}(\mathbf{k} - \mathbf{k}_{SIM}) + \frac{1}{2} \tilde{\rho}(\mathbf{k} + \mathbf{k}_{SIM}) \right) \quad (1.33)$$

Concrètement, la convolution avec une fonction δ de Dirac translate le spectre accessible de la fonction convoluée et le centre à la position de la fonction δ de Dirac. Étant donnée que l'excitation passe par le même objectif que la collection, nous avons nécessairement la condition $k_{SIM} \leq k_c = 2k_0 NA$ la fréquence de coupure du microscope. D'après l'équation 1.33, on peut voir que l'information contenue dans une seule image SIM permet d'identifier des fréquences de l'objet $\rho(\mathbf{r})$ jusqu'à $2k_c$. La résolution latérale est donc améliorée d'un facteur 2.

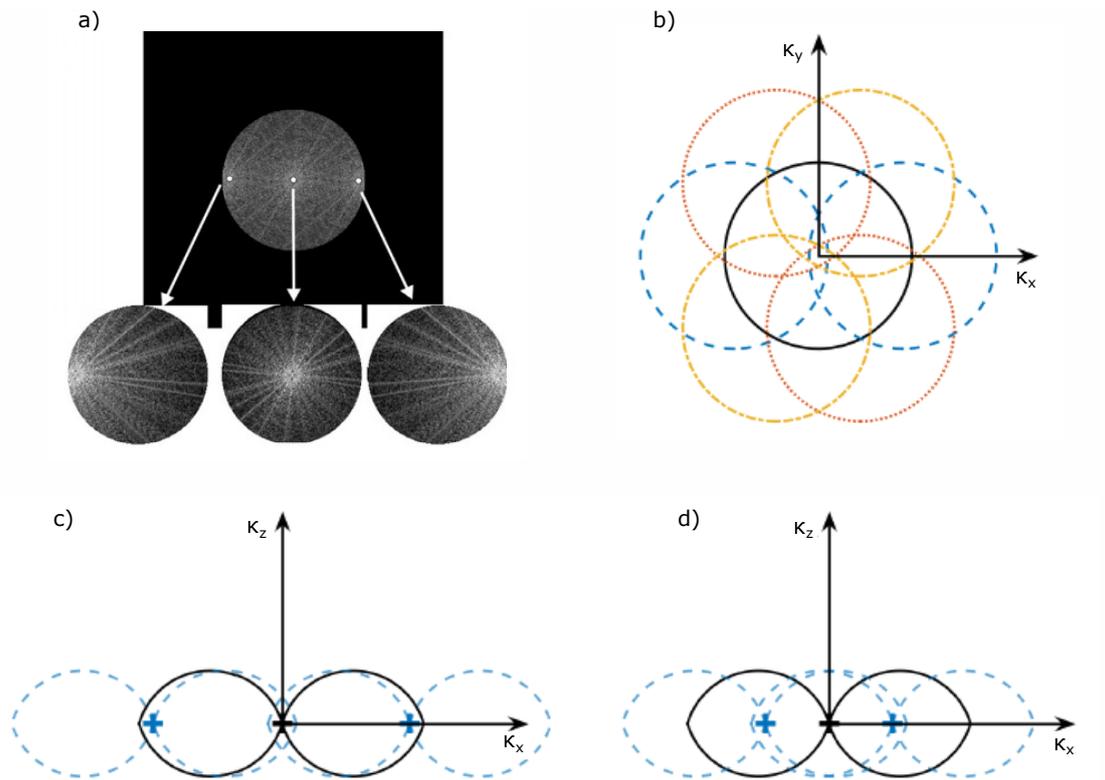


FIGURE 1.15 – a) Décalage des fréquences de l'objet sous illumination structurée à l'intérieur de l'OTF. b) Domaine de l'espace de Fourier dans le plan transverse couvert par 9 images SIM. c) Domaine de l'espace de Fourier dans le plan $(\mathbf{k}_x, \mathbf{k}_z)$ lorsque la fréquence de l'excitation est proche de la fréquence de coupure du microscope. Dans ce cas la résolution quasiment améliorée par deux mais aucun gain supplémentaire n'est apporté selon l'axe optique (toujours présence du *missing cone*). d) La fréquence de l'illumination est réduite de moitié par rapport à c), la résolution latérale est réduite, mais l'information manquante selon z à la fréquence nulle est apportée et permet un meilleur sectionnement optique. Adaptée de [61] et [34]

En pratique pour reconstruire une image SIM, nous avons besoin d'au moins trois images avec trois positions de la grille d'excitation différentes pour obtenir une reconstruction homogène et dans trois directions différentes pour qu'elle soit isotrope, soit un total de neuf images. Ce set d'images permet de construire pour chacune des trois directions un système de trois équations à trois inconnues que l'on peut modéliser sous forme matricielle par

$$\mathbf{I} = \mathbf{M}\mathbf{x} \quad \text{avec} \quad \mathbf{M} = \begin{pmatrix} 1 & 1 & 1 \\ 1 & e^{i\frac{2\pi}{3}} & e^{-i\frac{2\pi}{3}} \\ 1 & e^{i\frac{4\pi}{3}} & e^{-i\frac{4\pi}{3}} \end{pmatrix} \quad (1.34)$$

\mathbf{I} étant un vecteur de taille 3×1 contenant les données mesurées, \mathbf{M} une matrice 3×3 avec les coefficients contenant l'information sur la phase et l'orientation de la grille pour chaque image et \mathbf{x} un vecteur de taille 3×1 contenant respectivement les inconnues recherchées $\tilde{\rho}(\mathbf{k})$, $\tilde{\rho}(\mathbf{k}-\mathbf{k}_{SIM})$ et $\tilde{\rho}(\mathbf{k}+\mathbf{k}_{SIM})$. En inversant la matrice \mathbf{M} pour chacune des orientations, on peut ainsi reconstruire une image SIM [64].

Le TIRF-SIM souffre des mêmes problématiques en ce qui concerne l'excitation par des ondes non-évanescentes que le TIRF expliqué plus haut. Si on regarde le domaine de l'OTF 3D effective dans le cas où l'on souhaite obtenir la meilleure résolution latérale possible, c'est-à-dire avec $k_{SIM} = k_c$, aucune information supplémentaire n'est apportée au niveau du cône manquant et aucun sectionnement optique supplémentaire n'est apporté. En revanche, si l'on réduit la période de la grille en prenant $k_{SIM} = \frac{1}{2}k_c$, l'information manquante pour obtenir un sectionnement optique est complétée. Il y a donc un compromis à faire entre résolution latérale et axiale. Lorsque l'on fait du SIM dans sa configuration TIRF, l'angle de réflexion totale n'est atteint qu'autour de $k_{SIM} = 0.88k_c$ pour des échantillons biologiques. Cela ne laisse que très peu de liberté quant au choix de l'angle d'illumination qui est nécessairement au bord de l'ouverture numérique, donc quasiment pas de sectionnement optique. Il est néanmoins possible de réduire la période de la grille sans perdre le caractère évanescent de l'illumination en modifiant l'orientation d'un des deux faisceaux d'illumination. C'est la solution proposée par [33], dans laquelle l'illumination sinusoïdale est créée par un interféromètre de Michelson dont les miroirs sont conjugués avec le plan image du microscope, ce qui permet de modifier la période de la grille tout en restant en réflexion totale.

Enfin voici un autre point important à retenir concernant le TIRF-SIM. Nous avons vu que la reconstruction nécessitait la connaissance de la matrice \mathbf{M} , c'est-à-dire une très bonne connaissance de la position de la grille sur chaque image brute. Or pour être en configuration de réflexion totale, la période de la grille d'excitation est à la limite de résolution du microscope à la longueur d'onde d'excitation. En prenant en considération le décalage de Stokes de la fluorescence, à la longueur d'onde de détection la grille est à l'extrême limite, voir en dehors de l'OTF du microscope, peut donc ne pas être visible sur les images de fluorescence. À cela on peut ajouter qu'au bord de la pupille de l'objectif, et plus particulièrement ceux à haute ouverture numérique, de fortes aberrations sont présentes et risquent de déformer l'illumination. La première étape de la plupart des algorithmes de reconstruction SIM est la détection de la grille de lumière pour déterminer les coefficients de la matrice \mathbf{M} . Si ces derniers sont mal estimés, la reconstruction présente des artefacts [56], voir n'est pas du tout possible.

Pour toutes ces raisons, en plus de sa complexité expérimentale, le TIRF-SIM est très peu utilisé dans la communauté des microscopistes. Très peu d'articles ont été publiés sur des échantillons biologiques avec cette méthode, encore moins sur du vivant qui nécessite en plus une bonne stabilité de l'expérience dans le temps. Les rares articles présentant des résultats expérimentaux sur des échantillons vivants ont été obtenus soit avec un montage d'une grande complexité [19, 44, 91] afin de contrôler avec précision l'illumination et la polarisation de l'excitation ou bien avec des objectifs de microscopes en saphir ayant une ouverture numérique très importante de 1.7 [66, 44]. A notre connaissance, la seule démonstration de TIRF-SIM, sur échantillon biologiques vivants avec un objectif standard d'ouverture numérique 1.45, a été faite pour l'observation de la dynamique de mitochondries [17] en 2013.

1.5.2 Microscopie par détection de molécules uniques

Cette méthode développée par Eric Betzig en 2006, Prix Nobel de Chimie 2014 pour la mise au point de la microscopie PALM [9], et Zhuang (STORM) [92] exploite l'activation stochastique des fluorophores afin de détecter individuellement chaque molécule. Ces molécules ont une activité de fluorescence qui peut être contrôlée grâce à l'utilisation d'un laser UV (généralement 405nm). Chaque molécule peut être considérée comme une source ponctuelle et crée donc une tache de diffraction. Or si on se place dans un régime dans lequel le nombre de molécules qui émettent des photons simultanément est suffisamment faible, elles seront donc (statistiquement) suffisamment éloignées les unes des autres pour considérer que les taches d'Airy résultantes ne se superposent pas. Ainsi il est alors possible de déterminer leurs positions avec une précision bien meilleure que la limite de diffraction. En modélisant la PSF transverse par une fonction gaussienne 2D symétrique, les coordonnées de chaque molécule individuelle sont connues avec une précision nanométrique et permet ensuite la reconstruction finale d'une image super-résolue avec une résolution transverse de l'ordre de 10 à 20 nm [9, 92].

La microscopie par détection de molécules uniques regroupe deux méthodes, microscopie PALM (*Photo-Activated Localization Microscopy*) et STORM (*Stochastic Optical Reconstruction Microscopy*). Les techniques PALM/STORM reposent toutes deux sur le principe de la détection de molécules uniques présenté précédemment et sont rendues possibles grâce au développement de nouveaux fluorophores photo-activables ainsi que de nouvelles caméras (type EMCCD) capables de détecter ces molécules uniques. La différence entre PALM et STORM vient de la nature des fluorophores utilisés. Tandis que la microscopie PALM utilise des protéines fluorescentes pour marquer génétiquement la zone d'intérêt [45], la microscopie STORM utilise des fluorophores organiques fixés à des anticorps [7, 25]. Dans les deux cas les fluorophores suivent (dans le cas idéal) le cycle suivant : état *off*, état *on* après photo-activation, puis photo-blanchiment. En pratique, il arrive que le même fluorophore passe par plusieurs états *on* avant de définitivement s'éteindre, phénomène de clignotement (*blinking*). La résolution en SMLM dépend de la précision de localisation, et donc du nombre N de

photons détectés et est donnée par la relation suivante :

$$\delta = \frac{\Delta}{\sqrt{N}} \quad (1.35)$$

où Δ est la limite de diffraction qui est obtenue par un *fit* gaussien 2D et symétrique de la PSF de la molécule détectée. Deux autres paramètres expérimentaux doivent être pris en compte pour la résolution des images super-résolues, la taille a des pixels de la caméra et le bruit de fond b qui inclut la fluorescence parasite et celui du détecteur (*dark current*). Finalement la précision de localisation est donnée par la relation [102] :

$$\delta = \sqrt{\frac{\Delta^2}{N} + \frac{a^2/12}{N} + \frac{8\pi\Delta^4 b^2}{a^2 N^2}} \quad (1.36)$$

Une fois les coordonnées de toutes les molécules détectées et les précisions de localisation associées collectées, les images super-résolues doivent être reconstruites. Pour obtenir un résultat satisfaisant, la densité ρ de molécules détectées doit vérifier le critère de Nyquist-Shannon et donc satisfaire (pour une image en deux dimensions) l'inégalité :

$$\rho \geq \left(\frac{2}{\delta}\right)^2 \quad (1.37)$$

PALM et STORM ont toutes deux leurs avantages et inconvénients, les fluorophores organiques ont généralement un meilleur rendement de fluorescence, les images obtenues en STORM ont donc une meilleure résolution. Cependant, les protéines photo-activables sont encodées génétiquement ce qui facilite le marquage des cellules vivantes.

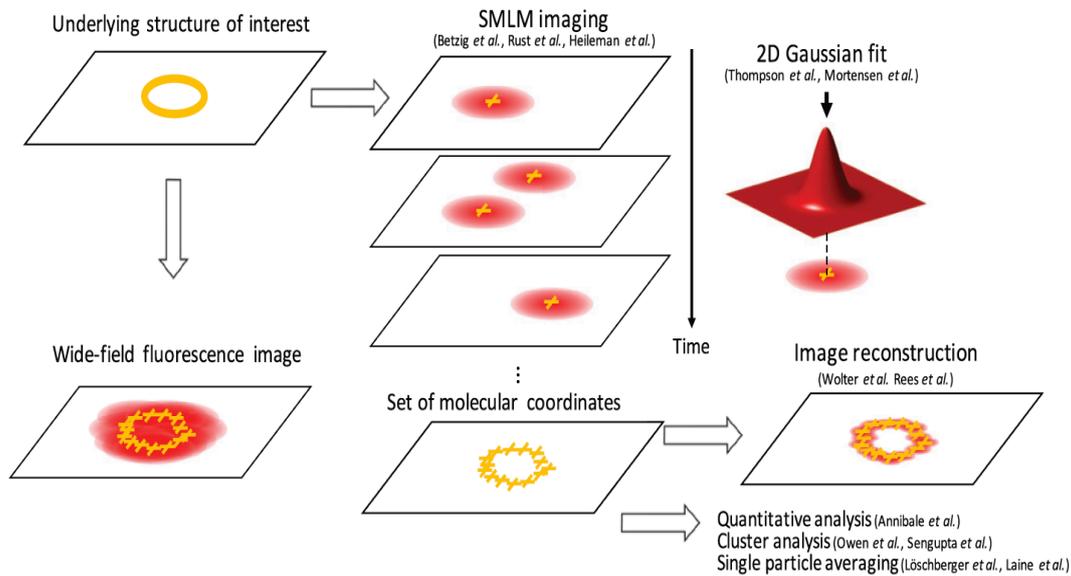


FIGURE 1.16 – Principe de la microscopie par détection de molécules uniques. Lorsque chaque point de l’objet (cercle jaune) émet de la fluorescence simultanément, les PSF de chaque point se recouvrent. En détectant les molécules une par une il est possible de localiser le centre de chacune des PSF par un *fit* gaussien pour ensuite reconstruire l’objet dont la résolution est la précision de localisation des molécules. Tirée de [63]

La microscopie SMLM est relativement simple à mettre en place, permet un gain d’un ordre de grandeur en dessous de la limite de diffraction et il existe plusieurs logiciels libres d’accès (comme ThunderSTORM et QuickPALM) pour la reconstruction des images. De plus la connaissance des coordonnées de chaque molécule permet de faire des analyses plus sophistiquées comme des mesures de densité de molécules ou l’analyse de *clusters* à l’échelle moléculaire [85, 94]. Pour toutes ces raisons la microscopie par détection de molécules uniques est une méthode d’investigation de choix pour l’étude de systèmes biologiques adoptée par un grand nombre de laboratoires.

Une méthode aussi basée sur la détection de molécules uniques appelée SOFI (pour *Super-resolution Optical Fluctuation Microscopy*) consiste non pas à utiliser des fluorophores qui clignotent une seule fois, mais aléatoirement et de manière décorréliées dans le temps et l’espace.

Dans la microscopie de fluctuation, l’échantillon est excité avec une intensité homogène et on profite de la fluctuation naturelle (ou clignotement) de la fluorescence par rapport au temps pour enregistrer différentes réalisations d’un processus d’imagerie aléatoire [27]. Les images peuvent être modélisées à l’aide de l’équation 1.3, $E_{i,j}$ étant maintenant une variable aléatoire représentant la fluctuation de l’émission.

La variance des données de la microscopie à fluctuation se résume à une simple convolution du carré de la densité de fluorescence avec la PSF carré.

$$\text{Var}(I) = \int \rho^2(\mathbf{r}') H^2(\mathbf{r}-\mathbf{r}') d\mathbf{r}' \quad (1.38)$$

Cette relation permet d'estimer le carré de la densité de fluorescence sur le support de Fourier de H^2 . Cependant, la connaissance de la transformée de Fourier de ρ^2 , $\mathcal{F}(\rho^2)$, sur un domaine W , n'implique pas la connaissance de $\mathcal{F}(\rho)$ sur W . Ainsi, sauf si ρ est binaire, la reconstruction super-résolue fournie par la microscopie à fluctuation doit être prise avec précaution, car elle dépend du carré de la densité de fluorescence. En particulier, la gamme dynamique de la concentration de fluorophores est généralement perdue. Les structures faiblement et fortement marquées sont alors souvent respectivement, sous-estimées et surestimées [72].

1.5.3 Microscopie STED

La microscopie STED (*Stimulated Emission Depletion*) mise au point par Stefan Hell [49] en 1994 qui lui valut le Prix Nobel de Chimie en 2014, repose sur la microscopie confocale à balayage assistée par un laser STED en forme de donut. Le laser STED sert à inhiber la fluorescence des fluorophores autour des régions à imager par émission stimulée. La lumière issue de l'émission stimulée ayant une longueur d'onde différente de la fluorescence, elle n'est pas vue par le détecteur. De cette manière grâce au faisceau de déplétion, la taille du spot de fluorescence peut descendre en dessous de la limite de diffraction pour atteindre une résolution transverse comprise entre 30 et 50nm [76].

1.6 Conclusion

Dans ce premier chapitre, nous avons vu que la microscopie de fluorescence est une méthode d'imagerie particulièrement appréciée en imagerie biologique. Elle permet de faire de l'imagerie fonctionnelle et très contrastée grâce à un marquage spécifique avec des fluorophores de l'échantillon à étudier. Cette méthode est cependant limitée en résolution par la limite de diffraction et ne permet pas d'observer de structures très fines à cause de la fluorescence provenant des plans en dehors du plan focal. Des méthodes ont alors été développées pour obtenir un sectionnement axial comme la configuration TIRF qui a alors été combinée à des techniques de super-résolution comme l'illumination structurée. Le TIRF-SIM réunit toutes les conditions pour faire de l'imagerie de membranes cellulaires ou autres structures très fines proches de la lamelle. Elle dépasse la limite de diffraction, donne un sectionnement optique de l'ordre de la centaine de nanomètres. C'est une méthode plein champ contrairement au microscope confocal, la microscopie à deux photons et au STED et ne requiert pas

de préparation particulière de l'échantillon à l'inverse de la microscopie à feuillet de lumière, la SMLM ou SOFI, et nécessite peu d'images contrairement aux dizaines de milliers utilisées en SMLM et SOFI ce qui permet d'envisager de faire de l'imagerie sur du vivant. Le TIRF-SIM semble alors être le meilleur compromis entre résolution spatiale, temporelle et complexité expérimentale. Malgré tous ces avantages, cette méthode reste très peu répandue à cause de sa complexité et du besoin impératif de connaître parfaitement l'illumination utilisée. Dans le chapitre suivant nous allons donc présenter l'alternative que nous avons développé pendant cette thèse, le TIRF-RIM et montrer que cela permet de nous affranchir des difficultés rencontrées avec le TIRF-SIM.

2 Microscopie super-résolue par éclairagements aléatoires

Sommaire

2.1	Introduction	54
2.2	Principes du RIM	55
2.2.1	Reconstruction statistique des images	55
2.2.2	Robustesse aux aberrations	57
2.2.3	Pouvoir de sectionnement du RIM	58
2.3	Théorie	59
2.3.1	Modélisation des données RIM	59
2.3.2	Capacité de super-résolution du RIM	60
2.3.3	Algorithme de reconstruction	62
2.4	Application du RIM en configuration de réflexion totale interne	69
2.4.1	Intérêt du TIRF-RIM	69
2.4.2	Speckles évanescents	71
2.5	Conclusion	75

2.1 Introduction

Dans le premier chapitre, nous avons brièvement vu quelques techniques de microscopie développées pour dépasser la limite de diffraction. Le STED et les méthodes par détection de molécules uniques (PALM/STORM/SOFI) améliorent la résolution latérale des images au coût d'une illumination intense et/ou d'acquisitions longues ce qui restreint les observations à des cellules fixées. La microscopie par éclairagements structurés (SIM) est un bon compromis entre résolution spatiale et temporelle et a une photo-toxicité réduite. Comme vu précédemment le SIM repose sur la bonne connaissance de l'illumination utilisée. Les distorsions de la grille de lumière induites par les aberrations des optiques ou causées par l'échantillon lui même peuvent empêcher la reconstruction ou bien induire des artefacts.

Récemment, il a été démontré théoriquement [55] et expérimentalement [62, 78, 71] que les illuminations structurées du SIM pouvaient être remplacées par des éclairagements aléatoires. Contre intuitivement, les images limitées par la diffraction obtenues sous des éclairagements aléatoires peuvent être traitées numériquement pour produire

une image super-résolue avec un gain de résolution d'un facteur 2, ce qui est comparable aux performances du SIM. L'utilisation d'éclairiments aléatoires semble être adaptée à l'imagerie des cellules vivantes en raison de sa facilité d'utilisation (pas de surveillance prolongée des dérives expérimentales, pas de protocoles d'étalonnage lors du changement d'échantillon, d'objectif ou de longueur d'onde d'excitation), sa configuration champ large, sa faible photo-toxicité et d'une configuration expérimentale extrêmement simple. Dans ce chapitre, nous détaillerons les principes de la microscopie basée sur les éclairiments aléatoires appelée *Random Illumination Microscopy* (RIM), qui combine une analyse statistique des données comme pour la microscopie à fluctuation et le principe de démodulation de la microscopie SIM.

Une fois les principes du RIM exposés, nous verrons comment l'adapter en configuration de réflexion totale interne (TIRF-RIM) ainsi que ses différences avec le RIM.

Le développement concernant les aspects théoriques généraux du RIM fait dans ce chapitre reprend, avec l'autorisation des auteurs, ce qui est présenté dans l'article [71] "Mangeat *et. al*, Super-resolved live-cell imaging using random illumination microscopy, *Cell Reports Methods* 1, 2021". Le traitement du bruit de variance ainsi que l'adaptation du RIM à la configuration de réflexion totale seront présentés dans "Affannoukoué *et. al*, Super-resolved dynamic imaging of podosomes using TIRF-RIM" à ce jour, soumis au journal *Optica*.

2.2 Principes du RIM

2.2.1 Reconstruction statistique des images

Le RIM consiste à numériquement reconstruire une image super-résolue de l'échantillon à partir d'images obtenues avec des éclairiments de speckles aléatoires. Il existe plusieurs méthodes pour produire ce type d'éclairiment. Un speckle est le résultat d'interférences aléatoires, il peut être obtenu à partir d'un faisceau de lumière cohérent ayant traversé un milieu diffusant, les diffusions multiples dans le milieu entraînant un grand nombre de trajets avec des différences de marches aléatoires. Un autre moyen de produire un speckle consiste à éclairer un modulateur spatial de lumière (SLM) sur lequel est affiché un masque de phase aléatoire. Le speckle peut également être généré en faisant passer un laser au travers d'une fibre optique mutli-modes, l'intensité en entrée se répartie dans les différents modes de la fibre ce qui produit une figure de speckle en sortie. Combiné avec un système vibrant il est alors possible de générer différents speckles entre chaque image. Un speckle est composé de grains de lumière aléatoirement distribués. Une illumination par de multiples points brillants peut s'apparenter au SIM à balayage multi-points [114] tandis que l'excitation aléatoire de l'échantillon se rapproche du principe de la microscopie à fluctuation (SOFI) [27]. L'algorithme de reconstruction développé à l'Institut Fresnel conjointement avec le LS2N à Nantes, appelé AlgoRIM, calculé la variance des images de speckle (images obtenues sous éclairiment de speckle) puis utilise les proprié-

tés statistiques spatiales de l'illumination pour améliorer la résolution. Une analyse mathématique rigoureuse a été faite dans [55] et montre que la résolution sous ces conditions peut être améliorée par deux ce qui est comparable au SIM. Le principe d'AlgoRIM consiste à estimer la densité de fluorescence de l'objet de sorte à minimiser la différence entre la variance théorique et la variance empirique calculée à partir des données expérimentales. La procédure de minimisation nécessite de connaître la fonction d'autocorrélation de l'illumination de speckle et de la PSF de détection du microscope. L'algorithme ne requiert pas de connaissance a priori de l'objet et permet une reconstruction linéaire avec sa densité de fluorescence.

Pour mettre en place le RIM expérimentalement, nous avons modifié un microscope de fluorescence grand champ standard en remplaçant la lampe par différentes diodes lasers et en introduisant un diffuseur monté sur moteur tournant et changeant de position entre chaque image comme dans [104]. Une autre méthode utilisée a été d'introduire un modulateur spatial de lumière (SLM), affichant des masques de phase aléatoires, le long du trajet d'illumination. Ce montage expérimental est plus rapide et permet d'obtenir des images RIM et SIM à des fins de comparaison. Plusieurs centaines de motifs de speckles différents peuvent être générés chaque seconde en changeant l'affichage du SLM. Le RIM peut être utilisé avec différents objectifs et longueurs d'onde d'excitation sans modifier les motifs du SLM, l'optique ou le réglage.

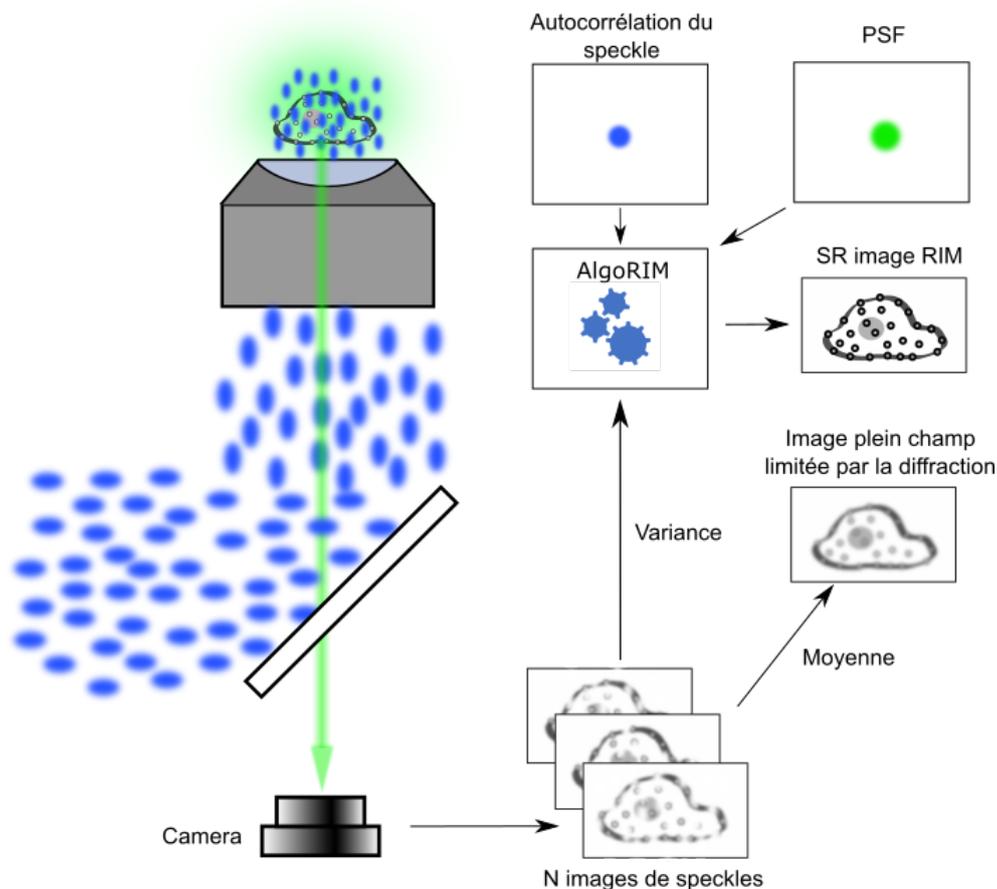


FIGURE 2.1 – Principe du RIM. L'échantillon est éclairé par des illuminations de speckle. N images, limitées par la diffraction, sont enregistrées. La variance des images est ensuite donnée en entrée de l'algorithme de reconstruction (AlgoRIM) ainsi que la fonction d'autocorrélation des speckles et la PSF du microscope.

2.2.2 Robustesse aux aberrations

Le principal atout du RIM est que l'autocorrélation du speckle, qui joue un rôle majeur dans la super-résolution du RIM [55], est bien connue et est insensible à la diffusion ou aux aberrations. En effet, les motifs de speckle ne sont pas statistiquement affectés même par de fortes aberrations comme cela a été démontré théoriquement par [39] et montré expérimentalement [71]. Ainsi, même dans de mauvaises conditions d'imagerie, le pouvoir de résolution du RIM est uniquement affecté par la détérioration de la PSF d'observation, à l'inverse du SIM, qui est également affectée par la détérioration de l'illumination. La résistance intrinsèque du RIM aux aberrations est d'une importance capitale pour l'imagerie des tissus en profondeur, le RIM a par exemple été utilisé pour imager des protéines motrices de myosine à différentes profondeurs à l'intérieur d'une patte fixée de drosophile [71].

Sur la Figure 2.2, sont représentés des speckles simulés (voir chapitre 3 pour plus de détails sur les simulations) avec leurs fonctions d'autocorrélations, sans aberrations, avec de l'astigmatisme et de la coma. Pour simuler les speckles avec des aberrations, un terme de phase est ajouté à la fonction pupille utilisé pour générer les speckles. Les termes de phase choisis pour l'illustration Figure 2.2 sont définis par les polynômes de Zernike, Z_2^2 pour l'aberration d'astigmatisme et Z_3^1 pour l'aberration de coma [13, 96]. Les PSF d'excitation aberrées de la Figure 2.2 correspondent au point de focalisation que l'on aurait dans le plan focal de l'objectif si l'on envoyait un faisceau collimaté recouvrant toute la pupille de l'objectif. On constate que les speckles et leurs fonctions d'autocorrélations correspondantes ne sont nullement affectées par la présence d'aberrations.

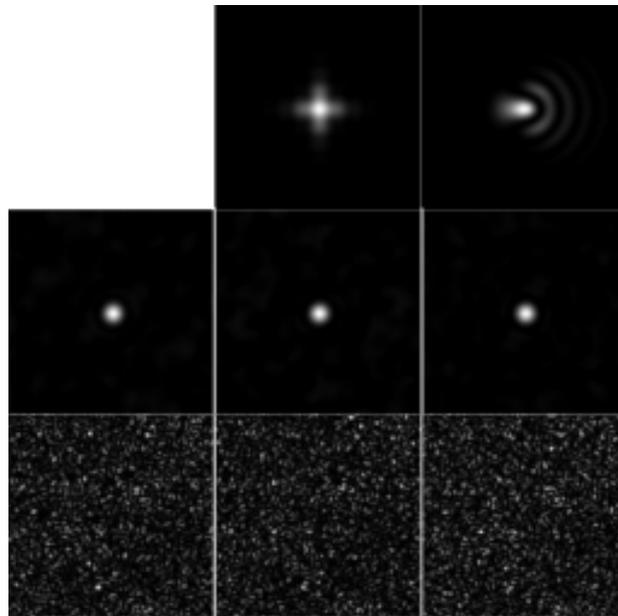


FIGURE 2.2 – Speckles avec aberrations, astigmatisme et coma. Ligne 1, PSF entachées d'abérations, astigmatisme (centre) et coma (droite). Ligne 2, fonctions d'autocorrélations. Ligne 3, speckles correspondants. Les fonctions d'autocorrélations et les speckles ne sont pas impactés par les aberrations, ils sont identiques au cas idéal (colonne 1).

2.2.3 Pouvoir de sectionnement du RIM

L'utilisation de la variance des images de speckle pour la reconstruction permet d'obtenir un sectionnement optique quasi-confocal [104]. En effet, la fluorescence provenant des plans autres que le plan focal de l'objectif, en se propageant, se moyenne et crée un fond fluorescent constant dépendant peu de l'illumination de speckle comme représenté Figure 2.3. En calculant la variance, ce fond étant le même sur chaque image, il est alors supprimé. Ainsi il est donc possible de faire des images d'un plan très contrasté et donc de faire de l'imagerie 3D en faisant des images RIM de plans suc-

cessifs [71] ou bien d'améliorer le contraste des images TIRF comme nous le verrons plus tard.

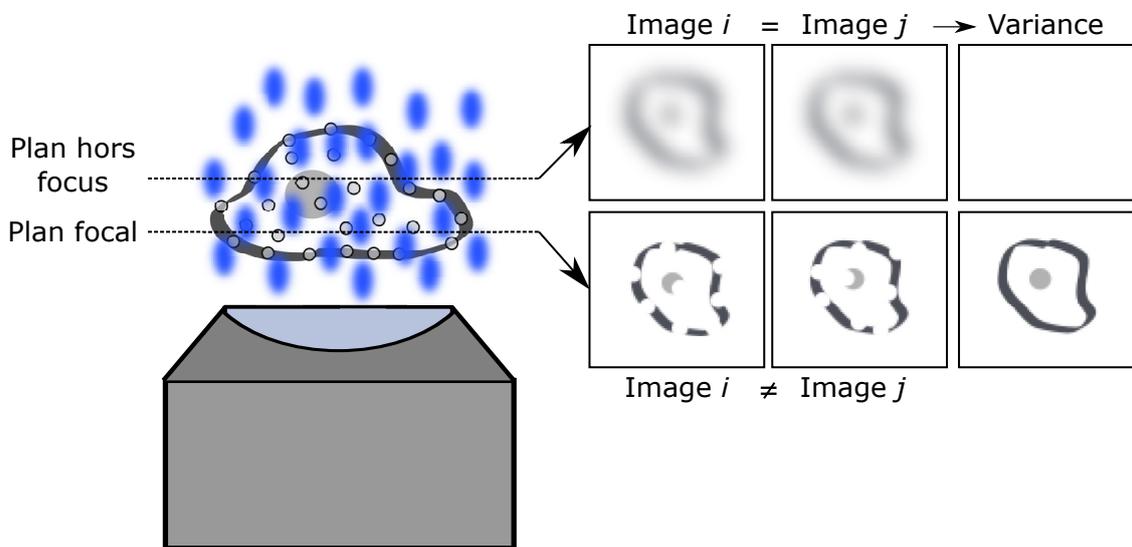


FIGURE 2.3 – Origine du sectionnement optique apporté par le RIM. La contribution de la fluorescence hors-focus étant approximativement la même sur toutes les images, sa contribution sur la variance est nulle.

2.3 Théorie

2.3.1 Modélisation des données RIM

Dans cette partie, nous expliquons comment la pile d'images de speckles à basse résolution est traitée afin de reconstruire une image super-résolue de l'échantillon. Nous supposons que l'objet d'intérêt est la fine tranche d'échantillon qui se trouve dans le plan focal du microscope [71]. La fluorescence provenant des marqueurs situés en dehors du plan focal est considérée comme étant du bruit. La densité de fluorescence de la tranche d'échantillon est désignée par $\rho(\mathbf{r})$ où \mathbf{r} est un vecteur bidimensionnel qui indique une position transversale au plan focal. L'intensité 2D I de l'image de speckle à basse résolution au point d'observation \mathbf{r}_{obs} de la caméra est une variable aléatoire qui peut être modélisée comme suit :

$$I(\mathbf{r}_{obs}) = \int \rho(\mathbf{r}) E_S(\mathbf{r}) H_{obs}(\mathbf{r}_{obs} - \mathbf{r}) d\mathbf{r} \quad (2.1)$$

où $\rho(\mathbf{r})$ est la densité de fluorescence, $H_{obs}(\mathbf{r})$ est la PSF à la longueur d'onde de fluorescence λ et $E_S(\mathbf{r})$ est l'intensité du speckle. En pratique, le motif de speckle est obtenu en plaçant un diffuseur sur la trajectoire d'un faisceau laser collimaté de longueur d'onde λ_0 et en collectant la lumière diffusée avec l'objectif du microscope.

Notez que dans notre microscope à épi-illumination, le speckle et la PSF d'observation sont formés via le même objectif d'ouverture numérique NA. Nous supposons que le speckle est entièrement développé [39]. Dans ce cas, il peut être modélisé comme une somme d'ondes planes avec un vecteur d'onde transversal \mathbf{k} et une phase aléatoire $\phi(\mathbf{k})$ uniformément distribuée entre 0 et 2π qui satisfont,

$$\langle \exp(i\phi(\mathbf{k})) \rangle = 0 \text{ et } \langle \exp(i\phi(\mathbf{k}) - i\phi(\mathbf{k}')) \rangle = \delta(\mathbf{k} - \mathbf{k}') \quad (2.2)$$

où $\langle \rangle$ représente la moyenne de l'ensemble. Nous avons vu dans la section 2.2.2 que le RIM était robuste face aux aberrations. En effet, les aberrations optiques reviennent à ajouter un terme de phase déterminé $\psi(\mathbf{k})$ à chacune de ces ondes planes. Alors la distribution de probabilité de $\phi(\mathbf{k}) + \psi(\mathbf{k})$ reste uniformément distribuée entre 0 et 2π . Par conséquent, même si les aberrations modifient le motif d'intensité d'une réalisation de speckle donnée, elles ne modifient pas sa statistique. L'intensité de speckle $E_S(\mathbf{r})$ à la position \mathbf{r} peut être modélisée comme suit,

$$E_S(\mathbf{r}) = \left| \int \tilde{h}_{exc}(\mathbf{k}) \exp[i\phi(\mathbf{k})] \exp[i\mathbf{k} \cdot \mathbf{r}] d\mathbf{k} \right|^2 \quad (2.3)$$

où $h_{obs}(\mathbf{k}) = 1$ si $|k| < 2\pi NA/\lambda$ et 0 ailleurs, dans l'approximation scalaire, est la pupille d'excitation. La moyenne d'ensemble théorique de E_S est la constante $\langle E_S \rangle$ et sa covariance Γ est définie comme :

$$\Gamma(\mathbf{r}, \mathbf{r}') = \langle [E_S(\mathbf{r}) - \langle E_S \rangle] [E_S(\mathbf{r}') - \langle E_S \rangle] \rangle \quad (2.4)$$

$$= \left| \int \tilde{h}_{exc}(\mathbf{k}) \exp[i\mathbf{k} \cdot (\mathbf{r} - \mathbf{r}')] \right|^2 \quad (2.5)$$

En utilisant l'équation 2.3, on montre que $\Gamma(\mathbf{r}, \mathbf{r}')$ est similaire à $H_{exc}(\mathbf{r} - \mathbf{r}')$, la fonction d'étalement du point du microscope à la longueur d'onde d'illumination λ_0 , définie comme,

$$H_{exc}(\mathbf{r}) = \left| \int \tilde{h}_{exc}(\mathbf{k}) \exp[i\mathbf{k} \cdot \mathbf{r}] d\mathbf{k} \right|^2. \quad (2.6)$$

Les premier et deuxième moments des speckles pleinement développés sont donc bien connus et ils sont insensibles à la distorsion de diffusion ou à l'aberration [39].

2.3.2 Capacité de super-résolution du RIM

Pour éliminer les illuminations inconnues de l'équation 2.1, nous formons la covariance de l'intensité des images [55],

$$\begin{aligned}
C(\mathbf{r}_{\text{obs1}}, \mathbf{r}_{\text{obs2}}) &= \langle [I(\mathbf{r}_{\text{obs1}}) - \langle I(\mathbf{r}_{\text{obs1}}) \rangle] [I(\mathbf{r}_{\text{obs2}}) - \langle I(\mathbf{r}_{\text{obs2}}) \rangle] \rangle \\
&= \langle I(\mathbf{r}_{\text{obs1}}) I(\mathbf{r}_{\text{obs2}}) \rangle - \langle I(\mathbf{r}_{\text{obs1}}) \rangle \langle I(\mathbf{r}_{\text{obs2}}) \rangle
\end{aligned} \tag{2.7}$$

Sous forme intégrale $C(\mathbf{r}_{\text{obs1}}, \mathbf{r}_{\text{obs2}})$ peut s'écrire sous la forme :

$$\begin{aligned}
C(\mathbf{r}_{\text{obs1}}, \mathbf{r}_{\text{obs2}}) &= \left\langle \int \rho(\mathbf{r}_1) E(\mathbf{r}_1) H_{\text{obs}}(\mathbf{r}_{\text{obs1}} - \mathbf{r}_1) \rho(\mathbf{r}_2) E(\mathbf{r}_2) H_{\text{obs}}(\mathbf{r}_{\text{obs2}} - \mathbf{r}_2) d\mathbf{r}_1 d\mathbf{r}_2 \right\rangle \\
&\quad - \left\langle \int \rho(\mathbf{r}_1) E(\mathbf{r}_1) H_{\text{obs}}(\mathbf{r}_{\text{obs1}} - \mathbf{r}_1) d\mathbf{r}_1 \right\rangle \left\langle \int \rho(\mathbf{r}_2) E(\mathbf{r}_2) H_{\text{obs}}(\mathbf{r}_{\text{obs2}} - \mathbf{r}_2) d\mathbf{r}_1 d\mathbf{r}_2 \right\rangle \\
&= \int \rho(\mathbf{r}_1) H_{\text{obs}}(\mathbf{r}_{\text{obs1}} - \mathbf{r}_1) \langle E(\mathbf{r}_1) E(\mathbf{r}_2) \rangle \rho(\mathbf{r}_2) H_{\text{obs}}(\mathbf{r}_{\text{obs2}} - \mathbf{r}_2) d\mathbf{r}_1 d\mathbf{r}_2 \\
&\quad - \int \rho(\mathbf{r}_1) H_{\text{obs}}(\mathbf{r}_{\text{obs1}} - \mathbf{r}_1) \langle E(\mathbf{r}_1) \rangle \langle E(\mathbf{r}_2) \rangle \rho(\mathbf{r}_2) H_{\text{obs}}(\mathbf{r}_{\text{obs2}} - \mathbf{r}_2) d\mathbf{r}_1 d\mathbf{r}_2
\end{aligned} \tag{2.8}$$

Les intégrales se factorisent, nous avons alors :

$$\begin{aligned}
C(\mathbf{r}_{\text{obs1}}, \mathbf{r}_{\text{obs2}}) &= \int \rho(\mathbf{r}_1) H_{\text{obs}}(\mathbf{r}_{\text{obs1}} - \mathbf{r}_1) \left[\langle E(\mathbf{r}_1) E(\mathbf{r}_2) \rangle - \langle E(\mathbf{r}_1) \rangle \langle E(\mathbf{r}_2) \rangle \right] \rho(\mathbf{r}_2) H_{\text{obs}}(\mathbf{r}_{\text{obs2}} - \mathbf{r}_2) d\mathbf{r}_1 d\mathbf{r}_2 \\
&= \int \rho(\mathbf{r}_1) H_{\text{obs}}(\mathbf{r}_{\text{obs1}} - \mathbf{r}_1) \Gamma(\mathbf{r}_1 - \mathbf{r}_2) \rho(\mathbf{r}_2) H_{\text{obs}}(\mathbf{r}_{\text{obs2}} - \mathbf{r}_2) d\mathbf{r}_1 d\mathbf{r}_2
\end{aligned} \tag{2.9}$$

Où nous avons utilisé la propriété d'invariance translationnelle du speckle $\Gamma(\mathbf{r}, \mathbf{r}') = \Gamma(\mathbf{r} - \mathbf{r}')$. Γ étant une fonction d'une seule variable, elle est assimilable à une fonction d'autocorrélation. La covariance des images ne dépend donc que de la fonction d'autocorrélation des speckles Γ connue et de la PSF d'observation H_{obs} . La covariance étant un opérateur défini non négatif, Γ et C admettent des racines carrées définies non négatives uniques $\Gamma^{1/2}$ et $C^{1/2}$ qui satisfont à [112]

$$\Gamma(\mathbf{r}_1 - \mathbf{r}_2) = \int \Gamma^{1/2}(\mathbf{r}_1 - \mathbf{r}') \Gamma^{1/2}(\mathbf{r}' - \mathbf{r}_2) d\mathbf{r}', \tag{2.10}$$

où l'invariance translationnelle des propriétés de speckle a été utilisée et,

$$C(\mathbf{r}_{\text{obs1}}, \mathbf{r}_{\text{obs2}}) = \int C^{1/2}(\mathbf{r}_{\text{obs1}}, \mathbf{r}') C^{1/2}(\mathbf{r}', \mathbf{r}_{\text{obs2}}) d\mathbf{r}' \tag{2.11}$$

Alors, la covariance de l'image peut être écrite comme,

$$C(\mathbf{r}_{\text{obs}1}, \mathbf{r}_{\text{obs}2}) \quad (2.12)$$

$$= \int d\mathbf{r}' \int \rho(\mathbf{r}_1) \Gamma^{1/2}(\mathbf{r}_1 - \mathbf{r}') H_{\text{obs}}(\mathbf{r}_{\text{obs}1} - \mathbf{r}_1) d\mathbf{r}_1 \int \rho(\mathbf{r}_2) \Gamma^{1/2}(\mathbf{r}' - \mathbf{r}_2) H_{\text{obs}}(\mathbf{r}_{\text{obs}2} - \mathbf{r}_2) d\mathbf{r}_2 \quad (2.13)$$

Maintenant, si le support en Fourier de Γ est égal ou inclus dans celui de H_{obs} , on peut filtrer les images de speckle de sorte que la fonction d'étalement du point H_{obs} devienne égale à $\Gamma^{1/2}$. Dans ce cas, l'opérateur K agissant sur la fonction q ,

$$K(q) = \int q(\mathbf{r}_1) \Gamma^{1/2}(\mathbf{r}_1 - \mathbf{r}') H_{\text{obs}}(\mathbf{r}_{\text{obs}1} - \mathbf{r}_1) d\mathbf{r}_1 \quad (2.14)$$

$$= \int q(\mathbf{r}_1) \Gamma^{1/2}(\mathbf{r}_1 - \mathbf{r}') \Gamma^{1/2}(\mathbf{r}_{\text{obs}1} - \mathbf{r}_1) d\mathbf{r}_1 \quad (2.15)$$

est défini et positif, il peut donc être identifié à la racine carrée de la covariance de l'image. Ensuite, en prenant les termes diagonaux, on obtient,

$$C^{1/2}(\mathbf{r}, \mathbf{r}) = \int \rho(\mathbf{r}_2) K(\mathbf{r} - \mathbf{r}_2) d\mathbf{r}_2 \quad (2.16)$$

où $K(\mathbf{r} - \mathbf{r}_2) = \Gamma^{1/2}(\mathbf{r} - \mathbf{r}_2) \Gamma^{1/2}(\mathbf{r} - \mathbf{r}_2)$. Lorsque le speckle est généré par le même objectif que la fonction d'étalement du point d'observation, le support en Fourier de $\Gamma^{1/2}$ est similaire à celui de H_{obs} , de sorte que le support de K est deux fois plus grand que celui de H_{obs} . Ainsi, d'un point de vue théorique, la covariance des images RIM porte suffisamment d'informations pour reconstruire la densité de fluorescence avec une résolution deux fois meilleure que celle de la microscopie de fluorescence classique. Notons que cette démonstration s'applique de manière identique à l'imagerie tridimensionnelle (3D) en remplaçant les images de speckles 2D, la PSF et la covariance de speckle par des images 3D [55].

2.3.3 Algorithme de reconstruction

Une technique d'inversion possible [55] consiste à estimer la densité de fluorescence de manière à minimiser la distance entre la covariance des images enregistrées et celles simulées. Pourtant, bien qu'efficace, cette approche ne peut pas être appliquée à de grands champs de vision, car elle est exigeante en termes de calcul, l'opérateur de covariance croissant comme $M \times M$ où M est le nombre de pixels de la caméra. Dans ce travail, nous proposons une approche simplifiée dans laquelle la densité de fluorescence est estimée de manière à minimiser la distance entre le modèle de variance $C(\mathbf{r}, \mathbf{r})$ et la variance empirique. Notez que la covariance $C(\mathbf{r}, \mathbf{r}')$ est maximale

en $\mathbf{r} = \mathbf{r}'$ et tend vers 0 lorsque \mathbf{r}' s'éloigne de \mathbf{r} avec une longueur de décorrélation typique correspondant à la largeur de la PSF d'observation. Ainsi, la plupart des informations sur la densité de fluorescence sont contenues autour de la diagonale de la covariance. Une fois que N images speckles différentes $I_{i=1\dots N}$ de l'échantillon ont été enregistrées, le traitement des données comprend les étapes suivantes :

- La première étape de la reconstruction consiste à déconvoluer les images brutes en appliquant un filtre de Tikhonov. Nous avons vu au chapitre 1 que lorsque l'image d'un objet est formée par un objectif de microscope, son spectre est filtré par l'OTF (transformée de Fourier de la PSF d'observation).

$$I(\mathbf{r}) = \rho(\mathbf{r})E * H_{obs}(\mathbf{r}) \quad (2.17)$$

La forme en "chapeau chinois" de l'OTF atténue progressivement les fréquences de plus en plus grandes jusqu'à la fréquence de coupure du microscope. Ensuite nous devons tenir compte dans notre modèle qu'une image expérimentale est perturbée par la présence de bruit décorréolé de moyenne nulle $\eta(\mathbf{r})$. Ce bruit est essentiellement dû à l'origine corpusculaire de la lumière (bruit de photons avec une statistique de Poisson) et au bruit électronique de lecture de la caméra. Une image expérimentale se modélise donc comme

$$I_{exp}(\mathbf{r}) = I(\mathbf{r}) + \eta(\mathbf{r}) \quad (2.18)$$

La déconvolution consiste à inverser l'opération de convolution de l'objet par la PSF pour restaurer les fréquences de l'objet qui ont été atténuées. Au-delà de la fréquence de coupure, il n'y a plus de signal utile, le filtre étant nul dans cette région, il permet également de supprimer le bruit.

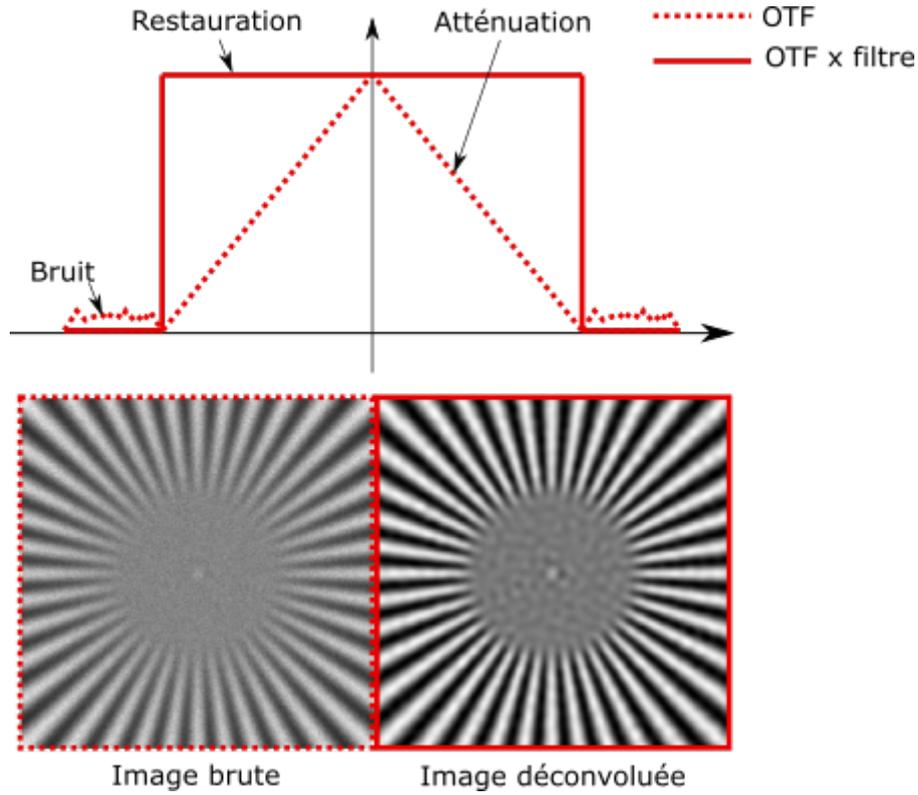


FIGURE 2.4 – Déconvolution

La déconvolution se fait par l'application du filtre suivant sur $\tilde{I}_{exp}(\mathbf{k})$:

$$\tilde{f}(\mathbf{k}) = \frac{\tilde{H}_{obs}^*(\mathbf{k})}{|\tilde{H}_{obs}(\mathbf{k})|^2 + \epsilon} \quad (2.19)$$

où ϵ est le paramètre de régularisation de Tikhonov. Ce paramètre permet lorsqu'il n'y pas de bruit, d'éviter la division par zéro au-delà de la fréquence de coupure et doit être le plus petit possible. Sur des images bruitées il doit être augmenté pour éviter d'amplifier le bruit et de générer des artefacts numériques.

- L'étape suivante consiste à estimer la variance du bruit $\langle \eta^2(\mathbf{r}) \rangle = W(\mathbf{r})$. Pour cela on fait l'approximation que le bruit est au-delà de la fréquence de coupure $k_{obs} = 2NA/\lambda$ définie par la PSF d'observation. On applique alors à chaque image un filtre $f_b(\mathbf{r})$ tel que $\tilde{f}_b(\mathbf{k}) = 0$ si $|k| < 2\pi NA/\lambda$ et 1 ailleurs. La multiplication par $\tilde{f}_b(\mathbf{k})$ est une convolution dans l'espace direct donc

$$(I_{exp} * f_b)(\mathbf{r}) = (I * f_b)(\mathbf{r}) + (\eta * f_b)(\mathbf{r}) \quad (2.20)$$

Par construction, le terme $(I * f_b)(\mathbf{r})$ est nul (car $\tilde{I}(\mathbf{k}) \times \tilde{f}_b(\mathbf{k}) = 0$). Alors on peut écrire la variance des images filtrées

$$\text{Var}[I_{exp} * f_b](\mathbf{r}) = \langle (\eta * f_b)(\mathbf{r})^2 \rangle \quad (2.21)$$

qui sous forme intégrale s'écrit

$$\text{Var}[I_{exp} * f_b] = \iint \langle \eta(\mathbf{r}_1)\eta(\mathbf{r}_2) \rangle f_b(\mathbf{r} - \mathbf{r}_1) f_b(\mathbf{r} - \mathbf{r}_2) d\mathbf{r}_1 d\mathbf{r}_2 \quad (2.22)$$

Or comme $\eta(\mathbf{r})$ est un bruit blanc son autocorrélation $\langle \eta(\mathbf{r})\eta(\mathbf{r}') \rangle$ peut s'écrire comme le produit d'une fonction delta de Dirac et une fonction poids notée $w(\mathbf{r})$

$$\langle \eta(\mathbf{r})\eta(\mathbf{r}') \rangle = w(\mathbf{r})\delta(\mathbf{r} - \mathbf{r}') \quad (2.23)$$

Finalement nous avons une estimation de la variance bruit $W(\mathbf{r}) = \text{Var}[I_{exp} * f_b]$

$$W(\mathbf{r}) = \int w(\mathbf{r}_1) f_b^2(\mathbf{r} - \mathbf{r}_1) d\mathbf{r}_1 \quad (2.24)$$

$$= (w * f_b^2)(\mathbf{r}) \quad (2.25)$$

En prenant la transformée de Fourier de l'équation 2.25 nous pouvons déterminer $w(\mathbf{r})$ sachant que w et W sont liés par la relation :

$$\tilde{w}(\mathbf{k}) = \frac{\tilde{W}(\mathbf{k})}{\tilde{f}_b(\mathbf{k}) * \tilde{f}_b(\mathbf{k})} \quad (2.26)$$

— La variance asymptotique $V^{asympt}(\mathbf{r})$ peut alors être estimée par :

$$V^{asympt}(\rho, \mathbf{r}) = \iint \rho(\mathbf{r}_1) H(\mathbf{r} - \mathbf{r}_1) \Gamma(\mathbf{r}_1 - \mathbf{r}_2) \rho(\mathbf{r}_2) H(\mathbf{r} - \mathbf{r}_2) d\mathbf{r}_1 d\mathbf{r}_2 + (w * f^2)(\mathbf{r}) \quad (2.27)$$

où nous avons introduit une nouvelle PSF $H(\mathbf{r}) = (H_{obs} * f)(\mathbf{r})$ qui tient compte de la déconvolution et où nous avons additionné l'estimation de la variance du bruit à l'intérieur de l'OTF avec le terme $(w * f^2)(\mathbf{r})$, possible grâce à l'estimation de w faite à l'étape précédente.

— Finalement la densité de fluorescence est reconstruite de manière itérative de sorte à minimiser la fonction coût $\mathcal{F}(\rho)$ qui est la distance entre la variance du modèle asymptotique et la variance empirique mesurée expérimentalement,

$$\mathcal{F}(\rho) = \int |V^{exp}(\mathbf{r}) - V^{asympt}(\rho, \mathbf{r})|^2 d\mathbf{r} / \int |V^{exp}(\mathbf{r})|^2 d\mathbf{r} \quad (2.28)$$

où $V^{exp}(\mathbf{r})$ est la variance empirique

$$V^{exp}(\mathbf{r}) = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N (I_i^f(\mathbf{r}) - \langle I^f(\mathbf{r}) \rangle)^2 \quad \text{où} \quad \langle I^f(\mathbf{r}) \rangle = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N I_i^f(\mathbf{r}) \quad (2.29)$$

avec $I_i^f(\mathbf{r})$ les images de speckle déconvoluées.

Sur des données expérimentales, le photo-blanchiment de la fluorescence peut être problématique pour l'estimation de la variance empirique, le niveau de signal n'étant pas le même entre la première et la dernière image utilisée pour son calcul. Une définition alternative de la variance appelée variance d'Allan [1] peut alors être préférable et est calculée de la manière suivante :

$$V^{Allan}(\mathbf{r}) = \frac{1}{2N} \sum_{i=1}^{N-1} (I_{i+1}^f(\mathbf{r}) - I_i^f(\mathbf{r}))^2 \quad (2.30)$$

Cette expression est bien équivalente à la première, en effet on peut montrer que :

$$V^{Allan}(\mathbf{r}) = \frac{1}{2N} \sum_{i=1}^{N-1} (I_{i+1} - \langle I \rangle - I_i + \langle I \rangle)^2 \quad (2.31)$$

$$= \frac{1}{2N} \sum_{i=1}^{N-1} (I_{i+1} - \langle I \rangle)^2 + \frac{1}{2N} \sum_{i=1}^{N-1} (I_i - \langle I \rangle)^2 - \frac{1}{N} \sum_{i=1}^{N-1} (I_{i+1} - \langle I \rangle)(I_i - \langle I \rangle) \quad (2.32)$$

$$= V^{exp}(\mathbf{r}) - \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N (I_{i+1} - \langle I \rangle)(I_i - \langle I \rangle) \quad (2.33)$$

Si on note $\alpha = I_{i+1} - \langle I \rangle$ et $\beta = I_i - \langle I \rangle$, α et β sont deux variables aléatoires de moyennes nulles. Le deuxième terme correspond à la moyenne du produit $\langle \alpha \beta \rangle$. Comme ces deux variables sont indépendantes, le deuxième terme est nul et on retrouve donc la variance empirique donnée par équation 2.29.

Bien que théoriquement identiques, sur des données expérimentales ces deux définitions peuvent donner des résultats très différents. Sur la Figure 2.5 est représentée l'évolution de l'intensité de fluorescence moyenne sur une cellule fixée sur laquelle l'actine a été marquée avec une GFP. L'intensité a été normalisée par la moyenne de la première image. Sur la Figure 2.5 sont également représentées les variances des mêmes données avec chacune des deux définitions. On peut constater l'importante différence entre les deux, avec la définition usuelle le pouvoir de sectionnement totalement perdu est retrouvé avec la définition alternative de la variance. On constate de plus sur cet exemple que le bruit de lecture des pixels de la caméra, qui fait apparaître des lignes verticales sur l'image de variance (zoom Figure 2.5.a), a été supprimé avec l'utilisation de la variance d'Allan.

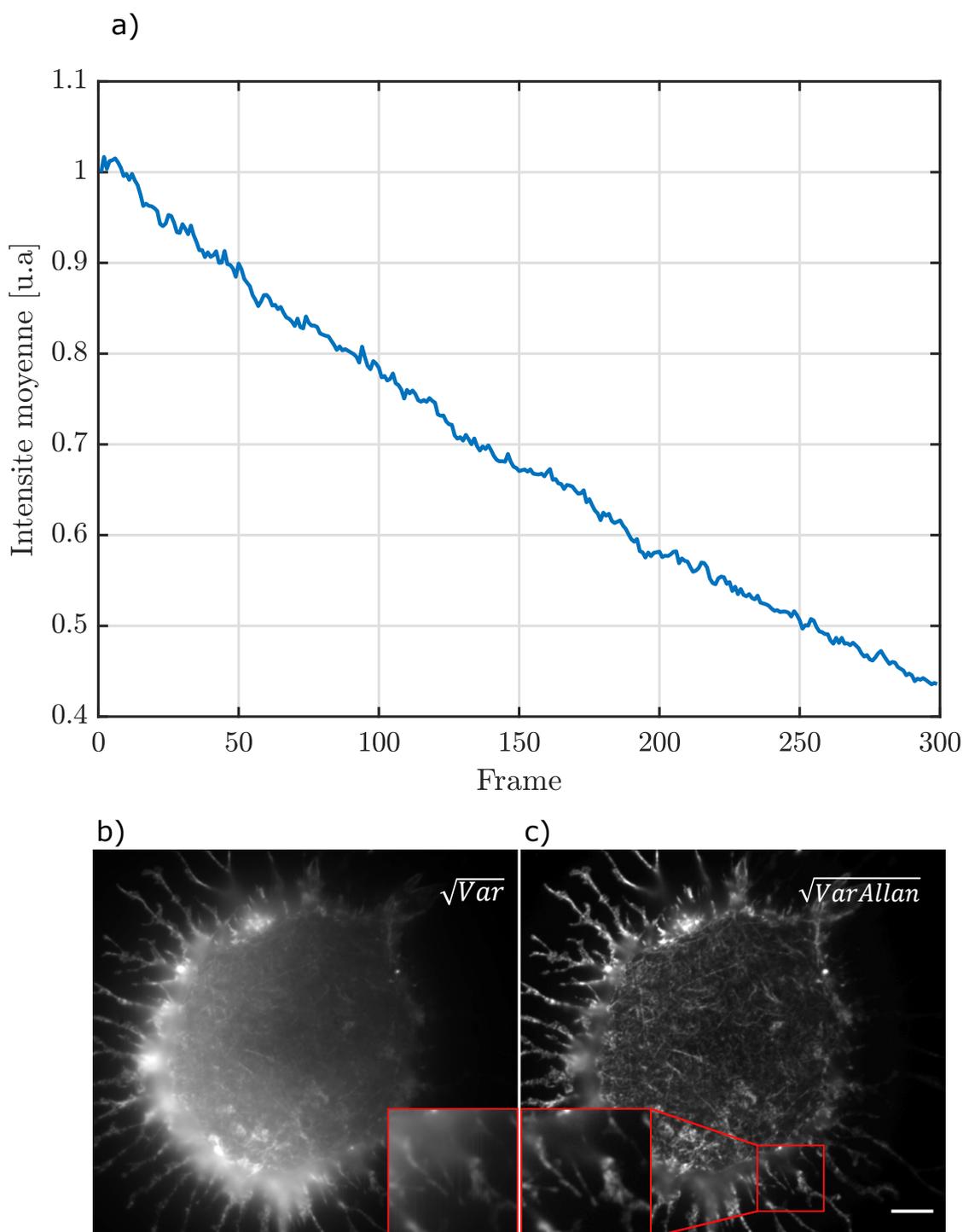


FIGURE 2.5 – a) Évolution de l'intensité de fluorescence moyenne d'une cellule en fonction du nombre d'illuminations de speckle. b) Écart-type calculé à partir de la variance telle que défini équation 2.29. c) Écart-type calculé à partir de la variance d'Allan telle que définie équation 2.30. Sur le zoom, on peut voir que les lignes verticales dues au bruit de lecture de la caméra, toujours présentes sur b) ont été supprimées.

Pour minimiser $\mathcal{F}(\rho, \mathbf{r})$ il faut être capable de calculer $V^{asympt}(\rho, \mathbf{r})$ pour une estimation de densité de fluorescence $\rho(\mathbf{r})$ donnée. Or $V^{asympt}(\rho, \mathbf{r})$ est une intégrale quadruple (équation 2.27) estimée numériquement à chaque itération ce qui est très coûteux en temps de calcul. Pour accélérer la procédure de reconstruction itérative, nous avons développé une expression approximative de $V^{asympt}(\rho, \mathbf{r})$ qui ne nécessite que le calcul d'une intégrale double. À cette fin, nous rappelons que les fonctions de deux variables peuvent être écrites comme une série du produit de fonctions d'une seule variable. Introduisons la fonction réelle bivariée,

$$T(\mathbf{r}_1, \mathbf{r}_2) = C(\mathbf{r}_1 - \mathbf{r}_2) H(-\mathbf{r}_1) H(-\mathbf{r}_2) \quad (2.34)$$

Étant un noyau défini non négatif, T admet une décomposition en valeurs propres comme,

$$T(\mathbf{r}_1, \mathbf{r}_2) = \sum_{k=1}^{\infty} U_k(\mathbf{r}_1) U_k(\mathbf{r}_2) \quad (2.35)$$

En pratique, T est discrétisée sur les pixels de la caméra et implémentée comme une matrice hermitienne. Sa décomposition en valeurs propres donne les vecteurs propres de norme décroissante U_k . Ensuite, la décomposition est arrêtée à l'ordre K, (K environ 10 est généralement suffisant pour avoir une estimation précise de T). On obtient ainsi une approximation de rang limité de T. D'autres approximations de rang limité sont possibles, mais celle que nous choisissons atteint un compromis optimal selon le théorème d'Eckart-Young [32]. La variance est ensuite calculée en utilisant,

$$V^{asympt}(\rho, \mathbf{r}) \approx \sum_{k=1}^K [\beta_k(\rho, \mathbf{r})]^2 + (w * f)(\mathbf{r}) \quad (2.36)$$

avec

$$\beta_k(\rho, \mathbf{r}) = \int \rho(\mathbf{r}_1) U_k(\mathbf{r}_1 - \mathbf{r}) d\mathbf{r}_1 \quad (2.37)$$

Il est intéressant de noter que la décomposition de $T(\mathbf{r}_1, \mathbf{r}_2)$ est beaucoup plus efficace que la décomposition de $\Gamma(\mathbf{r}_1, \mathbf{r}_2)$. En effet, nous avons constaté que le nombre de vecteurs propres requis pour l'approximation de T est significativement plus petit que celui requis pour l'approximation de Γ avec la même précision.

La minimisation de $\mathcal{F}(\rho, \mathbf{r})$ est effectuée à l'aide d'un algorithme standard de descente du gradient conjugué [8]. À chaque itération, $\rho(\mathbf{r})$ est modifié comme suit

$$\rho^n(\mathbf{r}) = \rho^{n-1}(\mathbf{r}) + \alpha g^n(\mathbf{r}) \quad (2.38)$$

où

$$g^n(\mathbf{r}) = -2 \int \left[\sum_{k=1}^K \beta_k(\rho^{n-1}, \mathbf{r}_1) U_k(\mathbf{r} - \mathbf{r}_1) \right] b(\mathbf{r}_1) d\mathbf{r}_1 \quad (2.39)$$

avec

$$b(\mathbf{r}_1) = V^{exp}(\mathbf{r}_1) - V^{asympt}(\rho^{n-1}, \mathbf{r}_1) \quad (2.40)$$

est le résidu et α est le scalaire qui minimise le polynôme d'ordre 4, $g(\alpha) = \mathcal{F}[\rho^{n-1} + \alpha g^n]$ (calculé analytiquement). Nous utilisons un arrêt précoce du processus itératif comme technique de régularisation simple (mais efficace) qui agit essentiellement comme une régularisation de Tikhonov [8, 103] pour tenir compte du bruit de variance.

2.4 Application du RIM en configuration de réflexion totale interne

2.4.1 Intérêt du TIRF-RIM

Nous avons vu au chapitre précédent le principe de la microscopie en réflexion totale interne (TIRF). Le TIRF exploite un champ évanescent induit à la frontière entre des milieux à fort et faible indice de réfraction pour exciter sélectivement l'échantillon à l'intérieur d'une région très fine (de 100 à 300 nm selon l'angle d'illumination) au-dessus de la surface de la lamelle sur laquelle est déposé l'échantillon. L'exposition minimale de l'échantillon à la lumière au-dessus de la tranche d'excitation réduit considérablement la fluorescence hors-focus ainsi que la phototoxicité qui sont des problèmes majeurs dans l'imagerie des cellules vivantes. Le TIRF est devenu un outil indispensable en biologie, en particulier pour étudier le trafic moléculaire au niveau des membranes plasmiques des cellules[3].

Cependant, dans de nombreuses applications, la résolution latérale du TIRF, qui est limitée par la diffraction à environ 200 nm, n'est pas suffisante. De plus, le sectionnement optique de l'illumination évanescente du TIRF est rarement parfait. Les ondes propagatives provenant d'imperfections de l'excitation (poussières sur les miroirs, défauts aux bords de l'objectif) et/ou de la diffusion de la lumière par l'échantillon lui-même sont capables d'exciter la fluorescence dans le volume de l'échantillon. Lorsque ce dernier est densément marqué, ces fuites génèrent de la fluorescence hors-focus qui détériore le contraste de l'image [107, 2, 16].

Au cours des vingt dernières années, la plupart des méthodes de super-résolution ont été adaptées à la configuration TIR, de la déplétion par émission stimulée [41] aux méthodes de localisation de molécules uniques [27] et le récent Minflux [20]. Parmi elles, la technique de Microscopie à Illumination Structurée (SIM) semble donner le meilleur compromis entre le gain de résolution et la capacité d'imagerie des cellules

vivantes [93].

En TIRF-SIM, l'image super-résolue de l'échantillon est formée numériquement à partir de plusieurs images à faible résolution enregistrées avec différentes positions et orientations de la grille de lumière d'excitation [58, 35]. Des grilles de lumières évanescentes à basse fréquence, obtenues avec un éclairage incohérent, se sont avérées améliorer le contraste des images TIRF ; tandis que les grilles de lumière à haute fréquence, obtenues à partir de l'interférence de deux faisceaux collimatés rasants contra-propageants ont amélioré la résolution latérale. En utilisant des objectifs à ouverture numérique de 1.7, cette approche a donné des images dynamiques impressionnantes de cytosquelettes [66] avec une résolution théorique inférieure à 100 nm (un gain multiplié par deux par rapport au TIRF standard). Une autre technique TIRF-SIM basée sur le balayage d'une matrice de spots évanescents et une reconstruction analogique a été récemment proposée avec une résolution latérale moindre, mais une résolution temporelle plus élevée [44].

La principale difficulté du SIM basée sur les interférences réside dans la précision avec laquelle le motif d'illumination doit être connu pour que la reconstruction réussisse. De légères erreurs sur l'estimation du motif produisent des artefacts dans l'image super-résolue reconstruite [24, 107]. Dans la configuration de réflexion interne totale, la grille d'excitation haute fréquence n'est que faiblement visible dans les images à basse résolution. Grands décalages de Stokes, un faible rapport signal/bruit ou un manque de contraste dû à la fluorescence hors-focus résiduelle rendent son estimation problématique [91, 107] ou même impossible. Il est alors nécessaire de diminuer la fréquence de la grille de lumière, au détriment de la résolution latérale ou bien de perdre la condition de réflexion totale.

Dans ce contexte, le RIM présenté plus haut semble être une technique idéale pour améliorer les performances du TIRF sans les limites et la complexité du SIM. En TIRF-RIM, l'image super-résolue de l'échantillon est obtenue à partir de la variance des images à basse résolution enregistrées sous des éclairages de speckles évanescents aléatoires. Les avantages du TIRF-RIM sont multiples : les speckles évanescents présentant des motifs à hautes fréquences spatiales, la résolution latérale et le rejet hors-focus peuvent être améliorés, la connaissance des illuminations étant inutile, les grands décalages de Stokes et les distorsions induites par l'échantillon ne sont pas problématiques. Enfin le TIRF-RIM est expérimentalement plus simple à mettre en œuvre.

Dans les chapitres 3 et 4 nous verrons des résultats numériques et expérimentaux sur des échantillons calibrés et des cellules vivantes avec une résolution bien inférieure à 100 nm.

2.4.2 Speckles évanescents

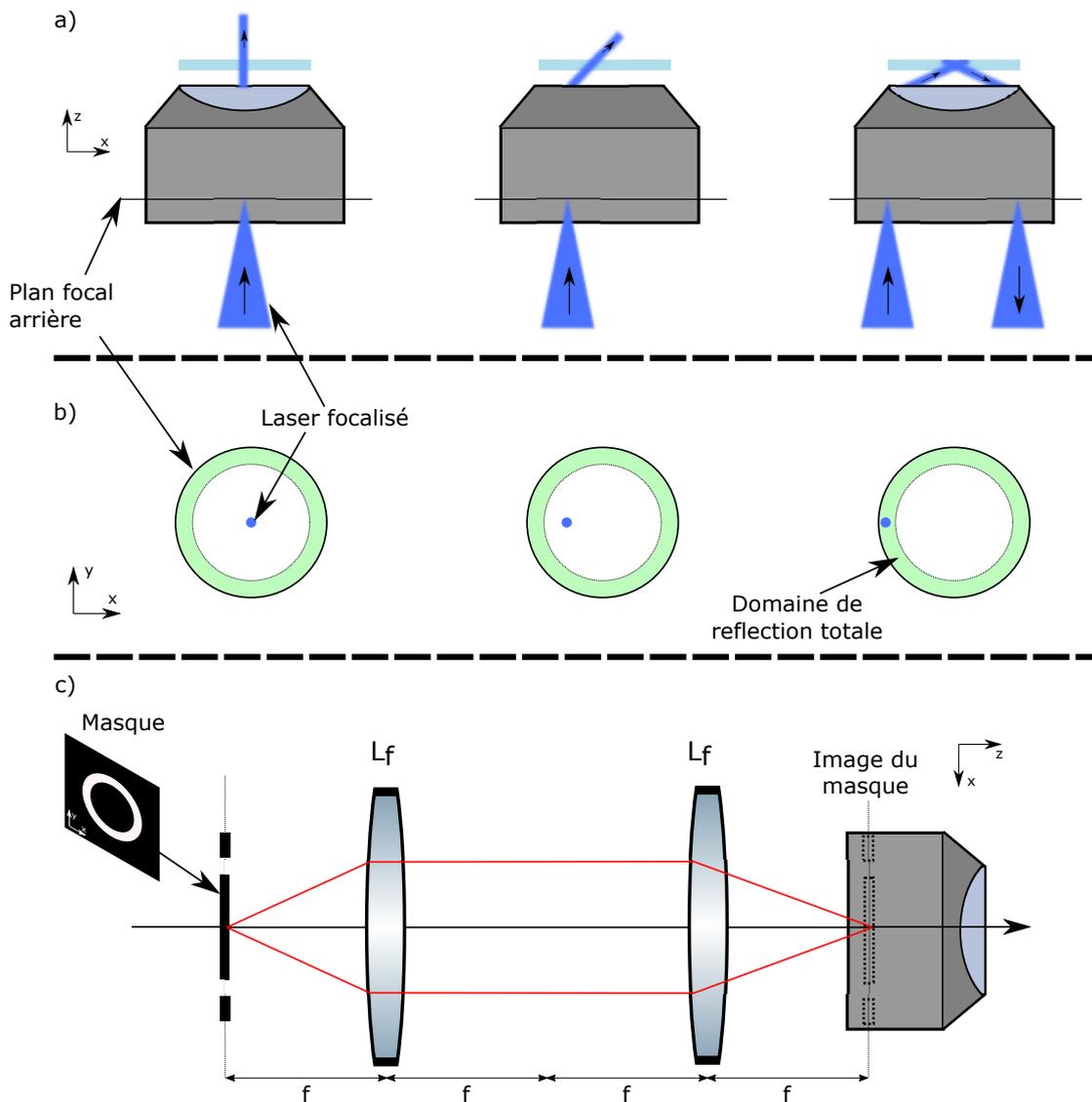


FIGURE 2.6 – a) Illumination en sortie de l’objectif pour différentes positions de focalisation du laser dans le plan focal arrière. b) Représentation du plan focal arrière et position de focalisation du laser pour les différentes configurations représentées en a). Le domaine de réflexion totale est indiqué en vert. c) Positionnement du filtre en forme d’anneau. L’image du masque est formée par l’association de deux lentilles (montage $4f$) dans le plan focal arrière de l’objectif.

La principale difficulté du TIRF-RIM est de générer des speckles évanescents. Pour ce faire, nous partons du montage expérimental du RIM où le diffuseur/SLM est situé dans un plan conjugué au plan focal de l’objectif (il est possible des générer les speckles avec le diffuseur dans un plan de Fourier). Pour rappel lorsqu’on focalise un

laser dans le plan focal arrière de l'objectif, il y a correspondance entre la position de focalisation du laser et l'angle du faisceau collimaté que l'on obtient en sortie (Figure 2.6). Plus le point de focalisation du laser est éloigné de l'axe optique, plus le faisceau en sortie est incliné. Toutes les positions dans le plan focal arrière de l'objectif correspondantes à un angle en sortie de l'objectif supérieur à l'angle de réflexion totale définissent une région en forme d'anneau que l'on appellera domaine de réflexion totale. Nous devons alors positionner dans un plan conjugué au plan focal arrière (ou plan de Fourier de l'objectif) un filtre spatial en forme d'anneau bloquant tous les rayons ayant un angle inférieur à l'angle de réflexion totale comme indiqué Figure 2.6.

Sur la Figure 2.7 on peut voir les différences significatives entre le speckle évanescent et le speckle propagatif obtenu sans le masque dans le plan de Fourier. Cette différence se traduit par une fonction d'autocorrélation différente, plus étroite et avec des lobes secondaires plus importants dans la cas évanescent. Le spectre de la fonction d'autocorrélation est donc aussi modifié. Tandis que celui de speckle propagatif est identique à celui d'une OTF classique avec une forme triangulaire, le spectre de la fonction d'autocorrélation du speckle évanescent décroît très vite aux basses fréquences, mais remonte proche de la fréquence de coupure. On rappelle que la fonction d'autocorrélation s'écrit de la manière suivante

$$\Gamma(\mathbf{r} - \mathbf{r}') = \langle E_S(\mathbf{r}) E_S(\mathbf{r}') \rangle - \langle E_S(\mathbf{r}) \rangle \langle E_S(\mathbf{r}') \rangle \quad (2.41)$$

$$= \left| \int \tilde{h}_{exc}(\mathbf{k}) \exp^{i\mathbf{k} \cdot (\mathbf{r} - \mathbf{r}')} d\mathbf{k} \right|^2 \quad (2.42)$$

où E_S est l'intensité du speckle et h_{exc} est la fonction pupille. On distingue alors deux situations, les speckles propagatif et évanescent, qui ont des fonctions pupilles différentes que l'on note respectivement h_{exc}^{prop} et h_{exc}^{evan} tel que :

$$\tilde{h}_{exc}^{prop}(\mathbf{k}) = \begin{cases} 1, & \text{si } |\mathbf{k}| \leq k_{exc} \text{NA} \\ 0, & \text{sinon} \end{cases} \quad (2.43)$$

dans le cas du speckle propagatif. Comme pour \tilde{h}_{obs} c'est un disque, mais dont le rayon est légèrement plus grand étant donné que $\lambda_0 < \lambda$. Dans le cas du speckle évanescent, \tilde{h}_{exc}^{evan} s'écrit :

$$\tilde{h}_{exc}^{evan}(\mathbf{k}) = \begin{cases} 1, & \text{si } n_2 k_{exc} < |\mathbf{k}| \leq k_{exc} \text{NA} \\ 0, & \text{sinon} \end{cases} \quad (2.44)$$

\tilde{h}_{exc}^{evan} définit alors un anneau correspondant au domaine de réflexion totale accessible avec un objectif d'ouverture numérique NA.

Nous pouvons remarquer que dans le cas propagatif la fonction d'autocorrélation Γ a exactement la même définition qu'une PSF. On peut d'ailleurs remarquer sur la Figure 2.7 que comme pour la tache d'Airy, le premier zéro est exactement situé à $\frac{0.61\lambda_0}{NA}$. Nous appellerons donc également la fonction d'autocorrélation (propagative ou évanescente) PSF d'excitation. Enfin nous rappelons que par conservation de l'énergie, le volume défini sous la surface du spectre de la fonction d'autocorrélation est identique entre le cas évanescent et propagatif. Cela explique la différence d'amplitude du spectre à la fréquence nulle entre les deux situations. Pour finir, nous pouvons supposer que la différence aux hautes fréquences sur le spectre de l'autocorrélation peut permettre au TIRF-RIM de mieux faire ressortir les hautes fréquences de l'objet reconstruit et donc d'obtenir une meilleure résolution. Cette hypothèse sera testée sur des données synthétiques au chapitre 3 puis expérimentalement au chapitre 4. Les comparaisons entre speckle évanescent et propagatif présentées Figure 2.7 sont des résultats de simulations numériques, nous verrons en détails comment les speckles ont été simulés au chapitre 3.

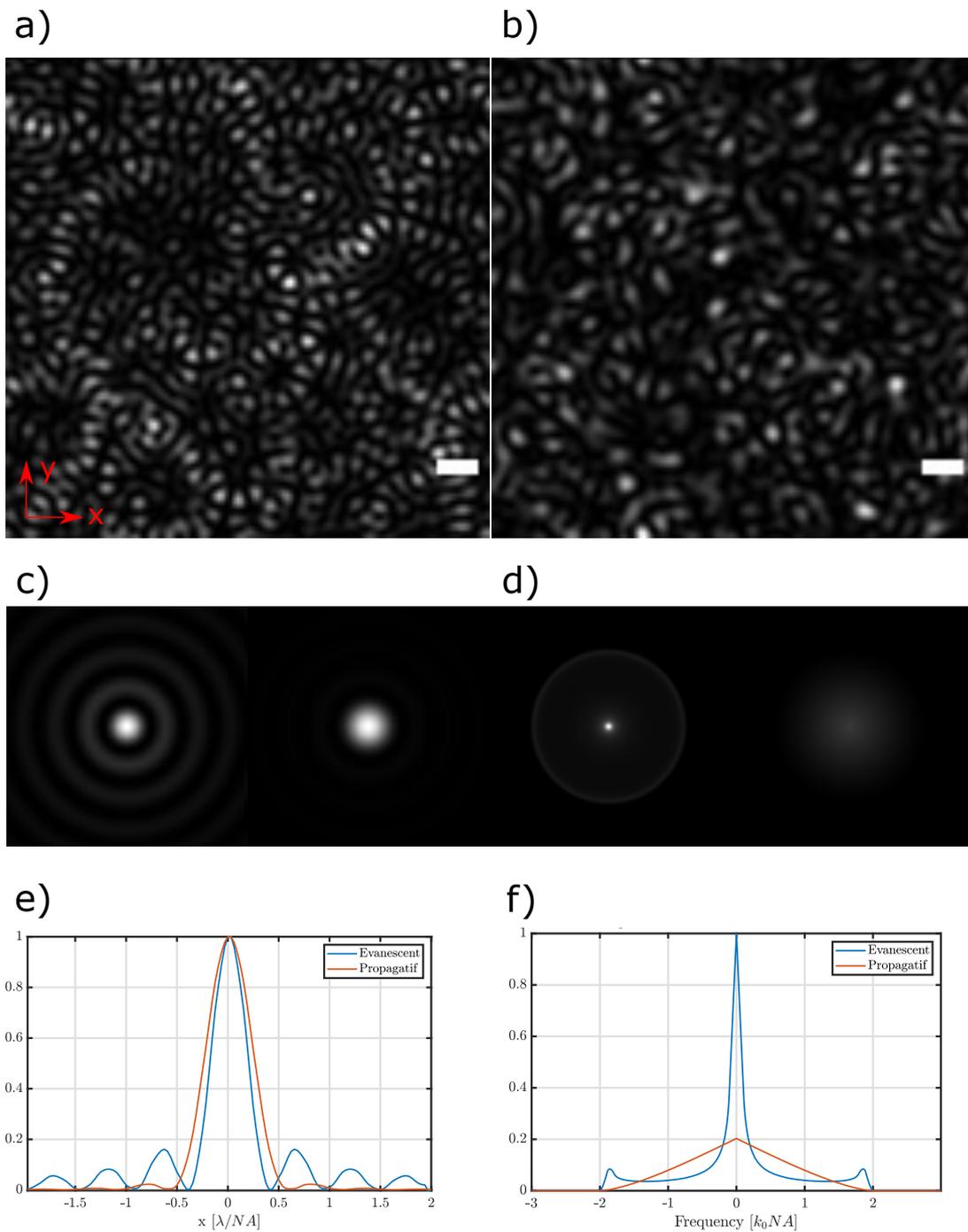


FIGURE 2.7 – Speckle évanescent a) et propagatif b). Bar d'échelle une unité de λ_0 . c) Fonction d'autocorrélation des speckles évanescent (gauche) et propagatif (droite). d) Spectre des fonctions d'autocorrélation des speckles évanescents (gauche) et propagatifs (droite). e) Profils d'intensité des fonctions d'autocorrélation des speckles. f) Profils d'intensité des spectres des fonctions d'autocorrélation.

2.5 Conclusion

Dans ce chapitre, nous avons décrit le principe de fonctionnement du RIM. C'est une technique qui, en combinant des éclairagements de speckles aléatoires et un traitement statistique des images, permet de faire une reconstruction de l'objet avec une résolution améliorée d'un facteur deux par rapport à la limite de diffraction. Pour fonctionner, l'algorithme se base sur la connaissance de la fonction d'autocorrélation des speckles ce qui rend la méthode robuste face aux aberrations que peut subir l'illumination. De plus l'utilisation de la variance des images permet d'obtenir naturellement un sectionnement optique supplémentaire. Enfin, nous avons vu qu'il était théoriquement possible d'obtenir des speckles évanescents en positionnant un masque en forme d'anneau pour adapter le RIM en configuration de réflexion totale interne.

3 Simulations numériques

Sommaire

3.1	Introduction	76
3.2	Modèle	76
3.3	Résolution RIM vs RIM-TIRF sur objet 2D	80
3.4	Uniformité de l'éclairement fonction du nombre de speckles	84
3.5	RIM vs SIM en congiguration TIRF	88
3.5.1	Fuites	88
3.5.2	Décalage de Stokes	91
3.6	Conclusion	92

3.1 Introduction

Dans ce chapitre, nous allons étudier numériquement les performances du TIRF-RIM sur des données synthétiques. Dans un premier temps, nous nous intéresserons à des objets bidimensionnels pour illustrer la différence de résolution latérale entre RIM et TIRF-RIM présenté théoriquement au chapitre 2. Des comparaisons avec le SIM et le plein champ déconvolués seront aussi montrés. Ensuite nous présenterons le gain sur le sectionnement optique sur des objets tridimensionnels en présence d'une excitation non-évanescence. Enfin, nous comparerons la robustesse de TIRF-SIM et TIRF-RIM en présence d'un grand décalage de Stokes.

3.2 Modèle

Pour commencer il est nécessaire de modéliser la PSF du microscope, que l'on notera ici $H_{obs}(\mathbf{r}, z)$. On note qu'ici \mathbf{r} est la projection transverse du vecteur position. La PSF correspond à l'image obtenue d'un point source situé en $(0, z)$ au travers du système et est ici simulé par le modèle scalaire et on rappelle son expression :

$$H_{obs}(\mathbf{r}, z) = \left| \int \tilde{h}_{obs}(\mathbf{k}) e^{i\mathbf{k}\cdot\mathbf{r}} e^{i\gamma(\mathbf{k})z} d\mathbf{k} \right|^2 \quad (3.1)$$

où $\gamma = \sqrt{(n_2 k_0)^2 - k^2}$, $k = \frac{2\pi}{\lambda}$, λ étant la longueur d'onde d'émission de la fluorescence. γ représente la propagation du champ électrique selon l'axe optique. De même que

pour \mathbf{r} , ici \mathbf{k} est la projection transverse du vecteur d'onde. La fonction pupille \tilde{h}_{obs} est définie telle que :

$$\tilde{h}_{obs}(\mathbf{k}) = \begin{cases} 1, & \text{si } |\mathbf{k}| \leq k_0 \text{NA} \\ 0, & \text{sinon} \end{cases} \quad (3.2)$$

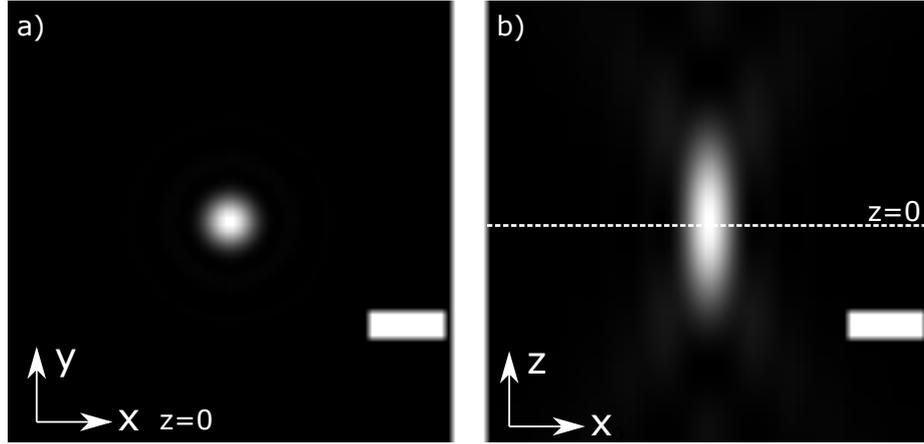


FIGURE 3.1 – PSF simulée $H_{obs}(\mathbf{r}, z)$. a) Dans le plan focal $H_{obs}(\mathbf{r}, z = 0)$. b) Vue en coupe dans le plan $x - z$, $y = 0$. Barre d'échelle 1 unité de λ .

En pratique, on modélise numériquement la grandeur complexe $\tilde{h} = \tilde{h}_{obs}(\mathbf{k}) e^{i\gamma(\mathbf{k})z}$ de manière discrète pour un plan z donné ($z = 0$ correspondant au plan focal)

$$\tilde{h}(k_i, k_j, z) = \begin{cases} e^{i\gamma(i\Delta k, j\Delta k)z}, & \text{si } \sqrt{(i\Delta k)^2 + (j\Delta k)^2} \leq k_0 \text{NA} \\ 0, & \text{sinon} \end{cases} \quad (3.3)$$

avec $(i, j) \in [-N/2, N/2 - 1]$, N étant la dimension des images simulées (pour simplifier et toujours avoir des tailles de pixel identiques dans toutes les directions de l'espace, on se restreint à la simulation d'images carrées, avec N une puissance de 2), et Δk la discrétisation dans l'espace de Fourier vérifiant la relation $N\Delta x\Delta k = 2\pi$ où Δx est la taille des pixels désirée dans l'espace image. La PSF et l'OTF d'observation sont alors obtenues par transformées de Fourier discrètes, calculées par l'algorithme de transformation de Fourier rapide [21] à deux dimensions (FFT2) et son inverse (iFFT2) tel que :

$$H_{obs}(x_i, y_j, z) = |\text{iFFT2}[\tilde{h}(k_i, k_j, z)]|^2 \quad (3.4)$$

et

$$\tilde{H}_{obs}(k_i, k_j, z) = \text{FFT2}[H_{obs}(x_i, y_j, z)] \quad (3.5)$$

La PSF d'observation ainsi obtenue est représentée sur la Figure 3.1. L'image simulée (2D) d'un objet de densité de fluorescence $\rho(x_i, y_j, z)$ est alors obtenue en faisant la convolution du terme $\rho(x_i, y_j, z)E(x_i, y_j, z)$ où E est l'intensité de l'éclairement, avec la PSF $H_{obs}(x_i, y_j, z)$. Ensuite nous sommes les contributions de chaque plan selon $z = k\Delta z$, avec $k \in [0, N_z - 1]$, N_z le nombre de plans nécessaire pour décrire l'objet 3D ρ et Δz la discrétisation de l'objet selon l'axe optique. Finalement l'image simulée $I(x_i, y_j)$ s'écrit

$$I(x_i, y_j) = \sum_{k=0}^{N_z-1} \text{iFFT2}[\tilde{H}_{obs}(k_i, k_j, k\Delta z) \times \text{FFT2}[\rho(x_i, y_j, k\Delta z)E(x_i, y_j, k\Delta z)]] \quad (3.6)$$

La modélisation de l'éclairement de speckle notée $E_S(\mathbf{r}, z)$ est très similaire et est donnée par :

$$E_S(\mathbf{r}, z) = \left| \int t(\mathbf{k}) \tilde{h}_{exc}(\mathbf{k}) e^{i\mathbf{k}\cdot\mathbf{r}} e^{i\gamma_{obs}(\mathbf{k})z} e^{i\Phi(\mathbf{k})} d\mathbf{k} \right|^2 \quad (3.7)$$

Cette expression est une généralisation en trois dimensions du modèle donné au chapitre 2 (qui était en deux dimensions). Nous avons pris en considération le coefficient de transmission complexe $t(\mathbf{k})$ à l'interface entre les milieux d'indices $n_1 = 1.51$ du verre et $n_2 = 1.33$ de l'eau, le terme de propagation du champ selon z , $e^{i\gamma_{obs}z}$ et $\Phi(\mathbf{k})$ un terme de phase aléatoire uniformément distribué dans l'intervalle $[0, 2\pi]$. Il est ici nécessaire d'introduire le coefficient de Fresnel $t(\mathbf{k})$ ¹ notamment pour prendre en considération la réflexion totale et obtenir le champ évanescent dans le milieu 2. Nous distinguerons évidemment les deux situations, speckles évanescents et propagatifs, en définissant une pupille d'excitation \tilde{h}_{exc} égale à 1 à l'intérieur d'un disque de rayon k_0NA dans le cas propagatif ou d'un anneau dans le cas évanescent.

Les speckles évanescents et propagatifs sont représentés Figure 3.2 dans un plan en coupe selon (x, z) . En coupe (x, z) on observe bien la décroissance exponentielle attendu pour dans le cas du speckle évanescent. Pour mieux en rendre compte, nous avons tracé l'évolution de l'intensité moyenne par plan en fonction de la distance z au plan focal, normalisée par l'intensité moyenne au plan $z = 0$. On remarque que pour le speckle propagatif, l'intensité moyenne selon z diminue entre 0 et $\lambda_0/2$ avant de converger vers une constante. Cette diminution proche du plan focal correspond à la fraction d'ondes évanescents présente dans le speckle propagatif étant donné que l'on garde toutes les fréquences transverses jusqu'à k_0NA .

1. Pour simplifier, nous avons uniquement pris en compte le coefficient de transmission d'ondes polarisés transverses électrique.

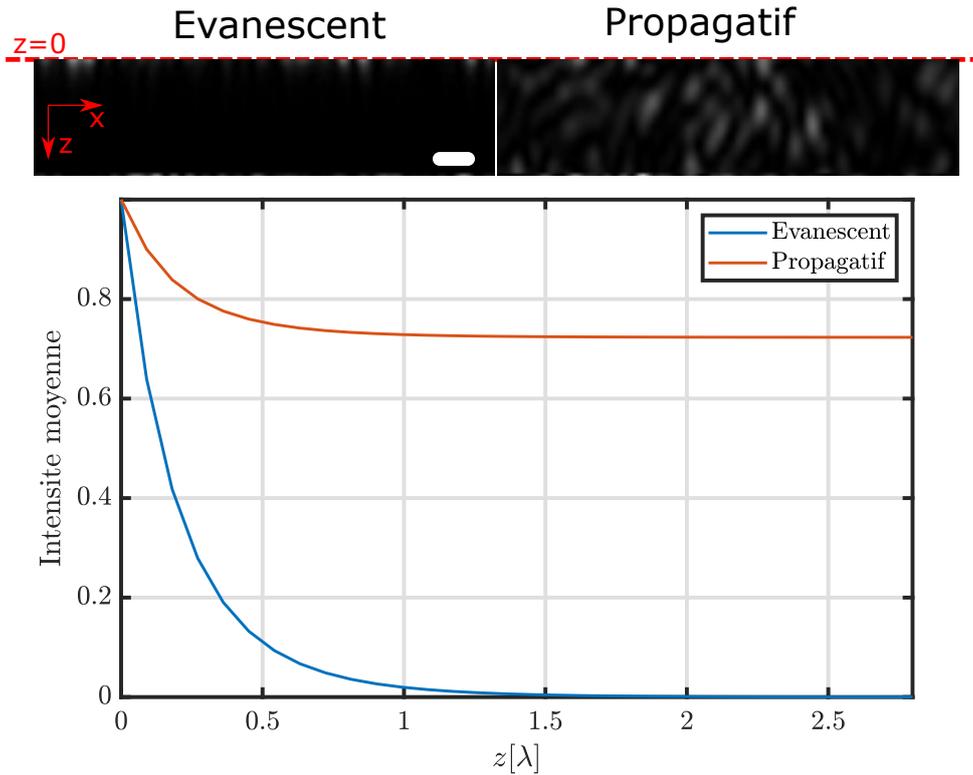


FIGURE 3.2 – Speckle évanescent/propagatif et évolution de l'intensité moyenne en fonction de z . Barre d'échelle 1 unité de λ_0 .

Enfin pour que notre modèle soit complet il faut que l'on puisse tester la robustesse du TIRF-RIM face aux fuites, *i.e* l'excitation non-évanescence décrite dans le chapitre 1. Dans un premier temps, la modélisation des fuites s'est limitée à l'addition d'une constante à l'illumination évanescente. Nous avons ensuite remis en question la signification physique de l'ajout d'une telle constante, celle-ci ne s'appuyant sur aucune observation expérimentale. À notre connaissance, il n'existe pas de modélisation simple des sources d'excitation non-évanescences. En effet, nous avons vu au chapitre 1 que celles-ci étaient la résultante de plusieurs facteurs (objet, objectif essentiellement) s'additionnant [16, 73], qui plus est de manière cohérente, la source d'excitation étant pour la plupart des TIRF un laser. Une solution possible aurait été de compléter notre modèle de microscope en modélisant la diffraction de l'objet par une méthode de DDA (*Discrete Dipole Approximation*) [29] comme dans [5] mais ceci aurait grandement complexifié notre modèle de microscope de fluorescence et largement rallonger les temps de calculs. Étant donné la nature supposée aléatoire de l'excitation non-évanescence, la solution que nous avons décidé de retenir a été de rajouter un speckle propagatif à l'illumination évanescente de sorte que l'intensité moyenne des speckles évanescent et propagatifs selon l'axe tende vers une limite qui est le pourcentage de fuite. Ce modèle est inspiré des différentes études expérimentales [16, 73, 81] essayant de mesurer la profondeur effective de pénétration d'une excitation TIRF. Ces études ont montré de façon empirique que la décroissance de

l'intensité avec la distance à l'interface était mieux modélisée par une somme de deux exponentielles. L'une à décroissance rapide (contribution évanescente) et une autre avec une décroissance beaucoup plus lente (contribution propagative) de plusieurs microns [73].

Pour évaluer le gain de résolution, nous avons choisi de prendre comme objet l'étoile de Siemens, défini par sa densité de fluorescence $\rho(\mathbf{r}, z)$:

$$\rho(\mathbf{r}, z) = [1 + \cos(n\theta)]\delta(z) + b(\mathbf{r}, z) \quad (3.8)$$

n étant le nombre de branches de l'étoile et tel que $\tan\theta = y/x$ et où $\delta(z)$ est la fonction delta de Dirac. La fonction $b(\mathbf{r}, z)$ représente des structures fluorescentes situées au-dessus de l'étoile que les fuites peuvent exciter et donc créer de la fluorescence hors-focus dégradant les images TIRF. Sauf mention contraire, $b(\mathbf{r}, z)$ sera composé des billes dont le rayon est de l'ordre de la longueur d'onde, réparties aléatoirement au-dessus de l'objet. Le nombre de billes est choisi tel que la fraction du volume occupé par les billes soit compris entre 5 et 20% du volume total de l'objet.

3.3 Résolution RIM vs RIM-TIRF sur objet 2D

Nous avons vu au chapitre précédent que la résolution des images RIM était dépendante de la fonction d'autocorrélation des speckles utilisés. Pour rappel, la fonction d'autocorrélation correspond à une PSF d'excitation. Dans le cas d'un speckle propagatif, où toute la pupille de l'objectif est remplie on retrouve, en Fourier, une OTF classique avec un maximum à la fréquence nulle puis qui décroît linéairement jusqu'à la fréquence de coupure $2k_0NA$. Il s'agit de l'autoconvolution de la pupille d'excitation $\tilde{h}_{exc}(\mathbf{k})$. Son module vaut 1 à l'intérieur d'un disque de rayon k_0NA et 0 ailleurs. Dans le cas d'un speckle évanescent, la pupille d'excitation $\tilde{h}_{exc}(\mathbf{k})$ est un anneau. Son module vaut 1 dans un domaine défini tel que $k_0NA_{min} < k < k_0NA_{max}$ et 0 sinon. En conséquence, la transformée de Fourier de la fonction d'autocorrélation décroît rapidement aux basses fréquences mais est croissante proche de la fréquence de coupure avant de tomber à 0, comme on peut le voir Figure 2.7. Lors de la reconstruction, les hautes fréquences sont rehaussées et la résolution est donc meilleure.

Pour illustrer ce gain de résolution, nous avons simulé des données RIM et TIRF-RIM sur l'étoile de Siemens. Les données sont simulées avec 400 speckles et échantillonnées avec une taille de pixel $dx = \frac{\lambda/(4NA)}{2}$, c'est-à-dire à deux fois la fréquence d'échantillonnage de Nyquist. Pour toutes les simulations, $dx = dy = dz$. Ce choix est fait de sorte à ne pas avoir à interpoler les images avant la reconstruction et éviter d'ajouter des artefacts numériques. La longueur d'onde λ d'émission est 525 nm, la longueur d'onde d'excitation λ_0 vaut 488 nm. L'ouverture numérique NA est 1.49. Sur la Figure 3.3 sont représentés l'objet, l'image plein champ déconvoluée, une image brute et une reconstruction pour RIM et TIRF-RIM. Les cercles rouges indiquent la limite de

résolution de l'image plein champ. En jaune la limite de résolution pour le RIM.

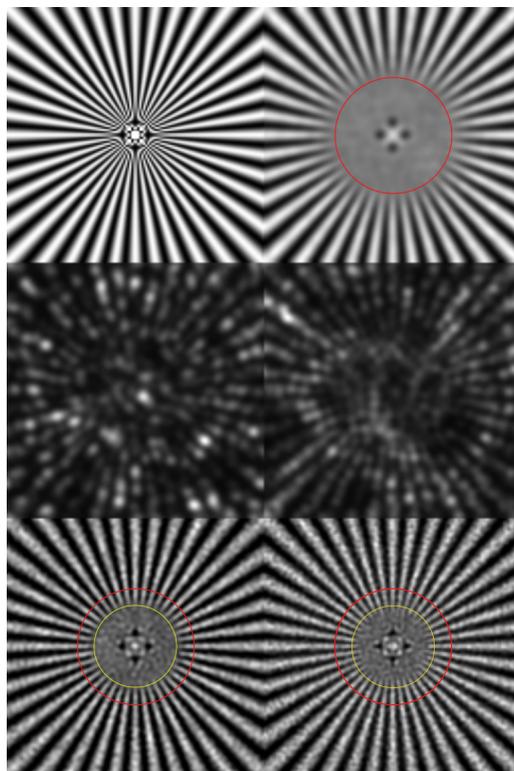


FIGURE 3.3 – Ligne 1 : Objet, image plein champ déconvoluée. Ligne 2 : Images brut (RIM et TIRF-RIM). Ligne 3 : Reconstructions RIM (gauche) et TIRF-RIM (droite). Les cercles rouge et jaune indiquent la limite de résolution de l'image plein champ et RIM respectivement.

Cette première simulation a été faite sans bruit de photons. Pour se rapprocher des conditions expérimentales, nous pouvons rajouter du bruit de Poisson sur les images. Dans les simulations suivantes, nous indiquerons le budget de photons global $n_{photons}$ défini comme étant le nombre maximum que peut collecter un pixel sur la totalité des images. Si N est le nombre de speckles utilisés alors un pixel collectera au maximum $\frac{n_{photons}}{N}$. Les résultats sont présentés Figure 3.4. Comme précédemment la limite de résolution pour RIM et TIRF-RIM est indiquée par les cercles de couleur. Pour un budget de photons supérieur à 5000 et $N = 400$ speckles, le gain de résolution pour TIRF-RIM est toujours nettement visible. En dessous de 5000 photons la super-résolution est perdue dans les deux modalités. Sur la Figure 3.4 est également représentée l'évolution de la fonction erreur $err(\rho)$ en fonction du nombre de photons définie comme suit :

$$err(\rho) = \frac{\sum_i^{n_x} \sum_j^{n_y} \|\hat{\rho}(\mathbf{r}_{ij}) - \rho(\mathbf{r}_{ij})\|^2}{\sum_i^{n_x} \sum_j^{n_y} \|\rho(\mathbf{r}_{ij})\|^2} \quad (3.9)$$

où $\hat{\rho}(\mathbf{r}_{ij})$ est la valeur de la reconstruction au pixel (i, j) , n_x, n_y le nombre de pixels selon les axes x et y . On constate une rupture à partir de 5000 photons, en dessous les reconstructions se dégradent fortement. Pour un grand nombre de photons (>15000) les reconstructions TIRF-RIM sont toujours meilleurs, ce que l'on peut expliquer par la résolution qui est améliorée par rapport au RIM classique.

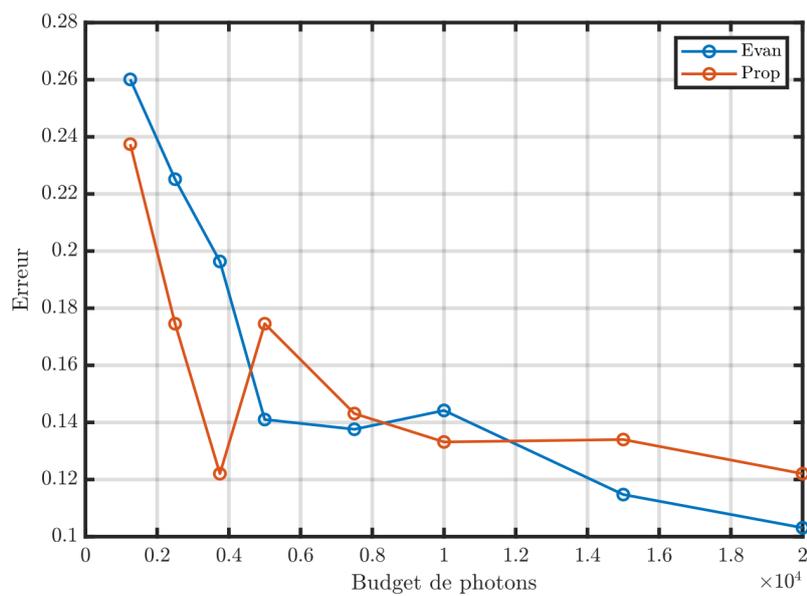
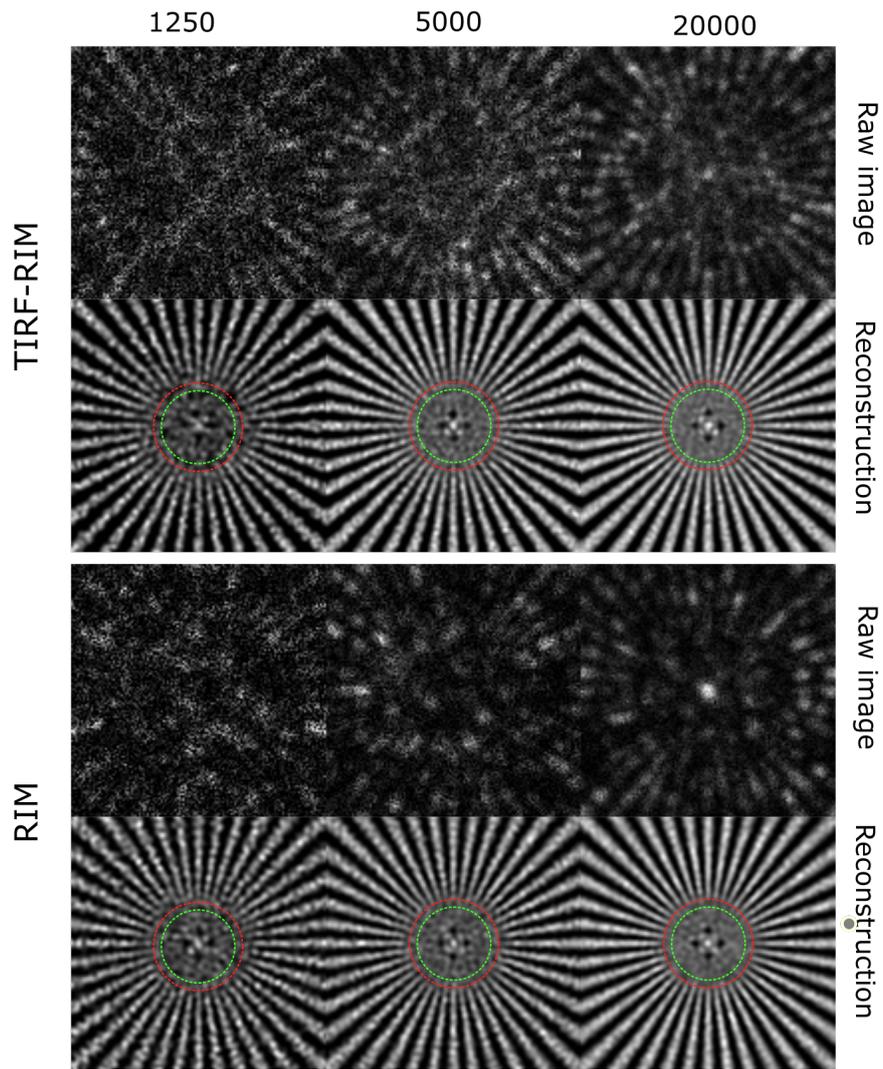


FIGURE 3.4 – Haut : Images brutes et reconstructions RIM et TIRF-RIM pour différents budgets de photons. Bas : Évolution de la fonction erreur en fonction du budget de photons.

3.4 Uniformité de l'éclairage fonction du nombre de speckles

La qualité des reconstructions en RIM est dépendante du nombre N d'illuminations de speckles utilisées. Évidemment plus N est grand, meilleure la reconstruction sera. Cependant, cela se fait au prix d'un temps d'acquisition plus long. Pour faire de l'imagerie sur des échantillons vivant le choix du nombre d'image pour la reconstruction d'une image RIM est important. Il a déjà été démontré que 200 à 400 [71] illuminations étaient suffisantes pour obtenir des images RIM. Un critère important de la qualité d'une reconstruction, autre que la résolution, est son homogénéité. De par la nature de l'illumination, des grains de speckle, il est possible que pour un objet constant, un aspect granuleux apparaissent sur la reconstruction dans le cas où le nombre d'illuminations n'est pas suffisant. Nous avons vu que le contenu fréquentiel des speckles évanescents et propagatifs est différent et a pour conséquence une résolution différente sur les reconstructions.

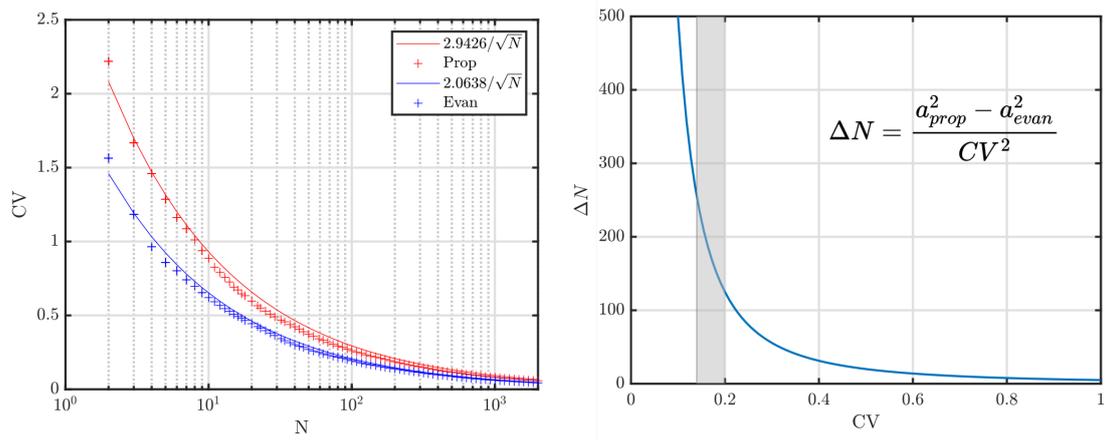


FIGURE 3.5 – Évolution du coefficient de variation CV sur les images de variances en fonction du nombre d'images N (gauche). Évolution de la différence d'images ΔN entre propagatif et évanescent en fonction de CV (droite)

Nous allons essayer de voir si dans le cas du TIRF-RIM la convergence est plus ou moins rapide qu'en RIM. Notre hypothèse est la suivante : comme la PSF d'excitation est plus piquée que la PSF d'émission dans le cas du speckle évanescent, et que les grains de speckles sont plus rapprochés les uns des autres, l'échantillon est illuminé de manière plus homogène. Moins d'illuminations sont donc nécessaires lorsqu'on utilise un speckle évanescent. Pour le vérifier nous avons simulé l'image produite par un objet constant avec des speckles évanescents et propagatifs. Il n'est pas nécessaire de faire des inversions sur des objets constants, il est de plus difficile de choisir correctement les paramètres de la reconstruction et cela ajouterait un biais sur les résultats. Nous allons alors calculer la variance des images (c'est la variance qui est donnée à l'algorithme de reconstruction) et calculer le coefficient de variation CV

en fonction du nombre N de speckles. Le coefficient de variation est définie par le rapport entre l'écart-type de l'image de variance σ_V et la moyenne de l'image de variance μ_V . Les résultats sont présentés Figure 3.5. On constate que CV suit une loi en a/\sqrt{N} , $a_{evan} < a_{prop}$ déterminés par *fit* avec la méthode des moindres carrés ($R^2 > 0.99$). L'évolution de CV , en fonction de N n'est pas très explicite en termes de gain en nombre de speckles nécessaires. Nous avons donc également représenté l'évolution de ΔN , : l'écart du nombre de speckles N donnant la même valeur de CV avec les résultats du *fit*. La zone grise encadre les valeurs de CV obtenue pour 300 et 400 speckles propagatifs.

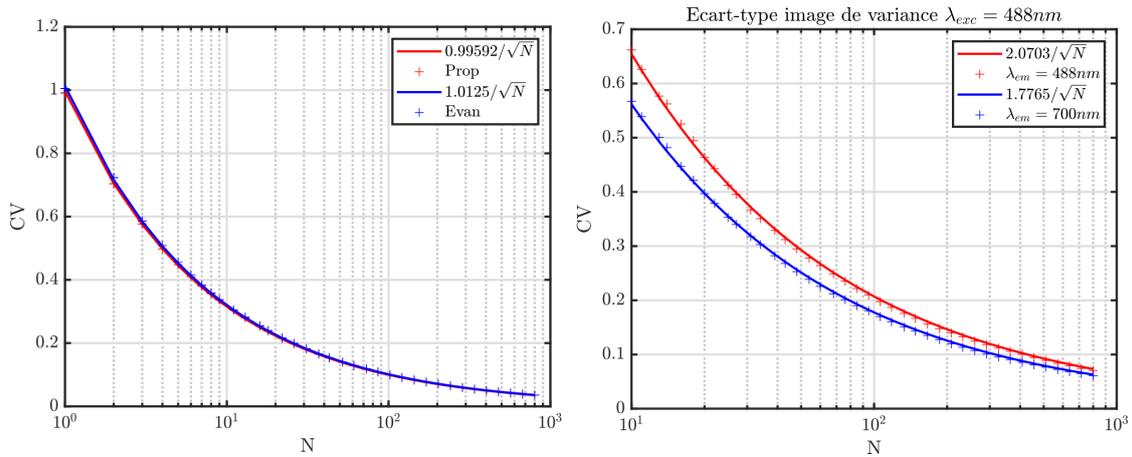


FIGURE 3.6 – Évolution du coefficient de variation CV sur la variance de l'illumination en fonction du nombre d'images N (gauche). Évolution du coefficient de variation CV sur les images de variances pour des speckles propagatifs à différentes longueurs d'ondes d'émissions.

Pour s'assurer que la différence entre TIRF-RIM et RIM était bien uniquement due à la différence de taille des PSF d'excitation et de détection, nous avons vérifié que le coefficient de variation était identique avant convolution avec $H_{obs}(r)$, ce qui revient à calculer le CV de l'illumination. Nous avons pu constater qu'ils étaient identiques et évoluaient comme $1/\sqrt{N}$ (Figure 3.6).

Pour définitivement confirmer l'hypothèse qui voudrait que la convergence plus rapide avec des speckles évanescents soit due à la variation de taille entre les PSF d'émission et d'excitation, nous avons répété l'expérience cette fois uniquement avec des speckles propagatifs mais avec des longueurs d'ondes de détections différentes. Dans un cas, la longueur d'onde d'émission et d'excitation sera la même $\lambda_0 = \lambda = 488nm$, dans un autre nous rajouterons un Stokes *shift* en choisissant $\lambda = 700nm$. Les résultats sont présentés Figure 3.6, on retrouve qu'à CV égal moins d'illuminations sont nécessaires.

Nous avons donc fait des reconstructions sur des données synthétiques, avec des speckles évanescent et propagatifs, en faisant varier le nombre d'illuminations. Nous

avons d'abord essayé de faire cette expérience sur un barreau constant puis calculé CV uniquement dans la région où est situé l'objet. Nous avons alors pu constater, voir résultats Figure 3.7, que CV suit la même tendance que le CV des speckles que nous avons vu précédemment Figure 3.5.

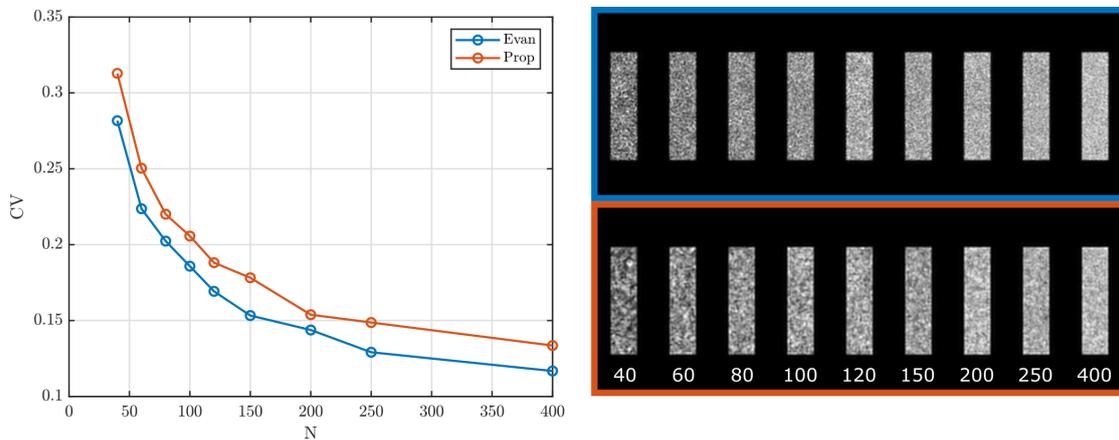


FIGURE 3.7 – CV calculé sur le barreau en fonction du nombre d'illuminations et les reconstructions TIRF-RIM (cadre bleu) et RIM (cadre orange).

Enfin une dernière expérience a été menée pour comparer l'impact du nombre d'illuminations sur les reconstructions RIM et TIRF-RIM. Cette fois, nous utilisons comme objet d'étude la mire de résolution et faisons des reconstructions pour chacune des modalités en faisant varier le nombre d'illuminations puis calculons l'erreur telle que définie par l'équation 3.9. Pour de petits nombres d'illumination (< 150) les résultats sont très fluctuants. Nous avons donc répété l'expérience plusieurs fois puis regardé l'évolution de la moyenne de l'erreur. On retrouve la même tendance que l'évolution du coefficient de variation lorsque nous avons étudié les objets constants précédemment. Ce résultat présenté Figure 3.8 confirme que le nombre d'illuminations nécessaire lorsque l'objet est éclairé par des speckles évanescent est moins important. Les moyennes représentées Figure 3.8 sont obtenues avec 20 répétitions lorsque le nombre d'illumination était inférieur ou égal à 100, 10 répétitions au-delà. Pour s'assurer que les distributions étaient significativement différentes, des tests paramétriques de Student ont été réalisés, les p -values correspondantes sont représenté en encart de la Figure 3.8.

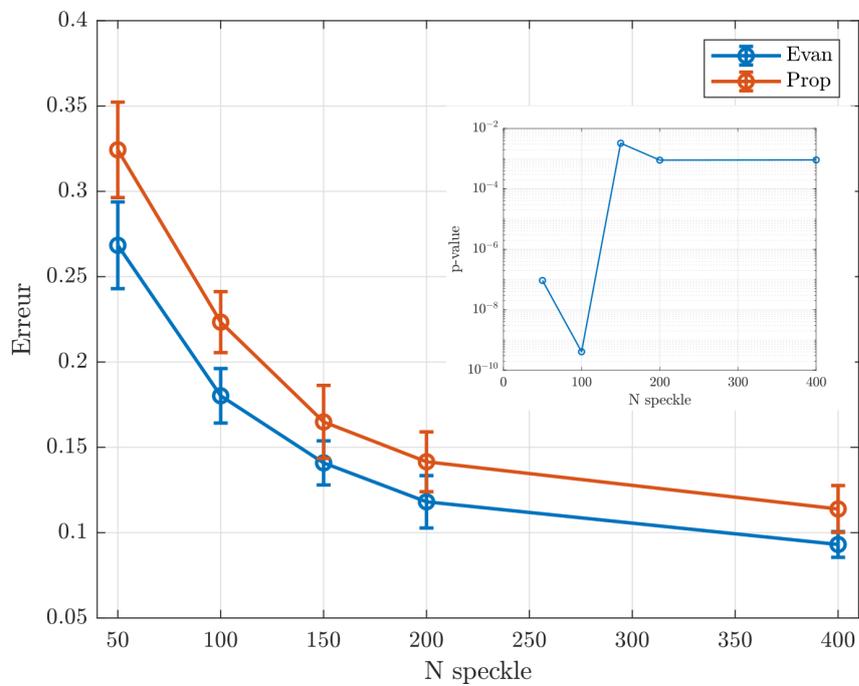
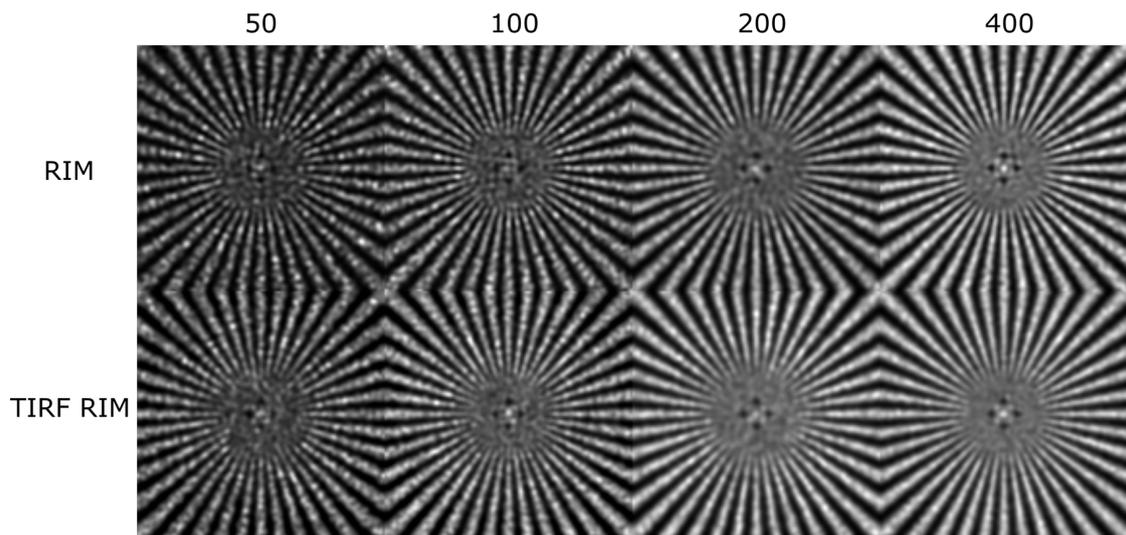


FIGURE 3.8 – Reconstructions en fonction du nombre d’illuminations. Haut, reconstruction RIM et TIRF-RIM pour différent nombre de speckles. Bas, erreur en fonction du nombre de speckles utilisés. Moyennes et incertitudes sont représentées et ont été obtenues à partir de 20 réalisation pour ($N_{speckle} \leq 100$), 10 réalisations sinon. En encart p -values, résultats d’un test de Student.

3.5 RIM vs SIM en configuration TIRF

3.5.1 Fuites

Dans cette section, nous étudions la robustesse et les performances de TIRF-RIM par rapport à TIRF et TIRF-SIM sur des données synthétiques. Nous considérons un échantillon composé d'un motif fluorescent en forme d'étoile (étoile de Siemens comme définit par l'équation 3.8) au plan focal recouvert de billes fluorescentes remplissant un volume de 5 microns d'épaisseur, voir Figure 3.9 et éclairé à $\lambda_0 = 488nm$. Les données ont été générées en utilisant un modèle de formation d'image tridimensionnelle qui tient compte des fluorophores situés en dehors du plan focal, de la décroissance exponentielle de l'illumination et la PSF 3D décrite au début de ce chapitre. Comme nous l'avons discuté au chapitre 1, la PSF tridimensionnelle ne permet pas d'obtenir un bon sectionnement optique à cause du *missing cone* de l'OTF correspondante. Pour une comparaison équitable, les images TIRF grand champ, TIRF-SIM et TIRF-RIM ont été simulées avec le même budget de photons correspondant à un maximum de 40000 photons par pixel Nyquist. Pour simuler le speckle évanescant, on somme des ondes planes avec un angle d'incidence sur la lamelle variant continument de l'angle de réflexion totale à l'angle maximum atteignable avec l'ouverture numérique de l'objectif. La profondeur de pénétration est donc résultante de toutes ces ondes planes chacune de profondeur de pénétration différente. Pour faire des simulations comparables, l'angle d'incidence choisi pour générer les grilles de lumière en SIM est tel que la décroissance exponentielle soit équivalente à celle des speckles.

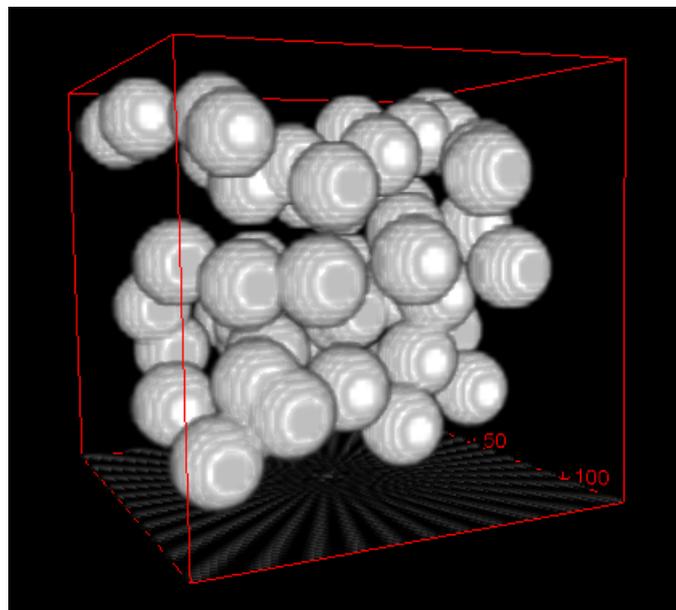


FIGURE 3.9 – Objet 3D. Billes fluorescentes au-dessus de la mire de résolution (étoile de Siemens) à imager.

Pour tenir compte d'éventuelles fuites d'illumination, nous avons ajouté au champ incident évanescent RIM et SIM, un champ de speckle propagatif dont l'intensité à $z = 0$ est égale à une fraction de l'intensité évanescente. Selon [73, 16] cette fraction de fuite peut représenter jusqu'à environ 10% de l'intensité totale d'excitation. L'intensité totale de l'illumination moyenne dans le plan z lorsque z tend vers l'infini tend vers la fraction de fuites comme illustré Figure 3.10. Pour z petit devant la profondeur de pénétration, la décroissance est exponentielle, l'excitation est donc principalement évanescente. À l'inverse pour z grand devant la profondeur de pénétration, l'intensité moyenne tend vers une constante qui est la proportion d'excitation non-évanescente.

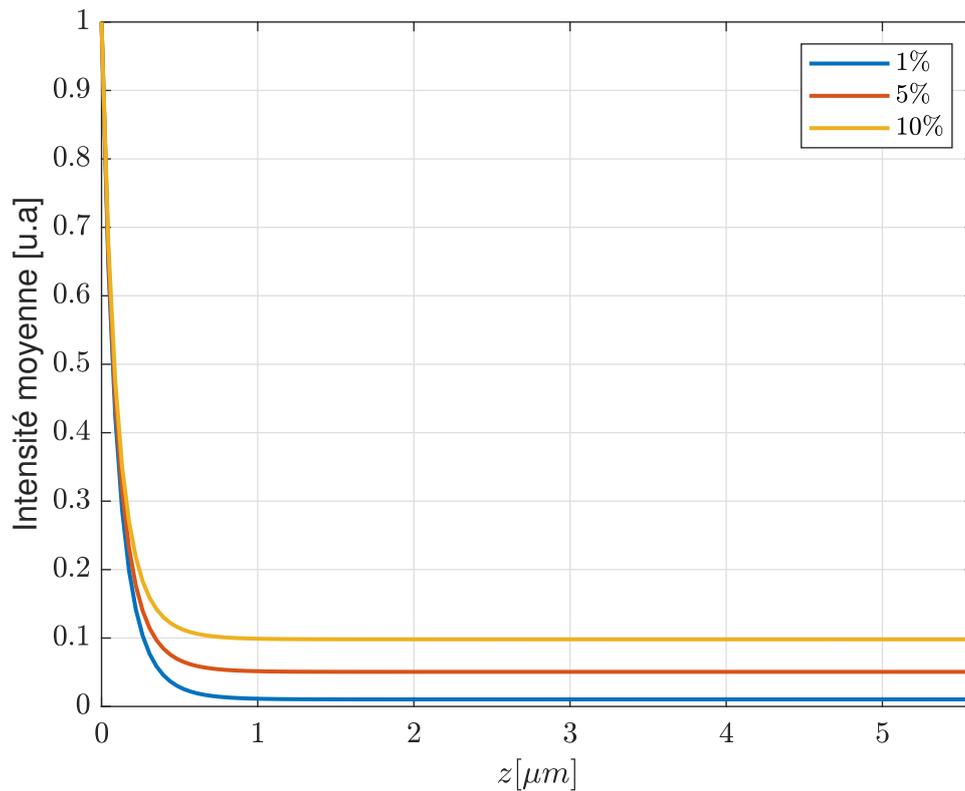


FIGURE 3.10 – Intensité moyenne en fonction de z d'un speckle évanescent pour différents niveaux de fuites.

La Figure 3.11 montre que les données brutes RIM sont beaucoup plus bruitées que SIM car le même budget de photons est répartie sur les 400 images de speckle pour le RIM à comparer avec 9 images pour le SIM. La Figure 3.11 montre également l'image TIRF déconvoluée et les reconstructions TIRF-SIM et TIRF-RIM qui ont été obtenues à l'aide d'AlgoRIM, le programme de reconstruction d'images RIM développé dans l'équipe, et du plugin ImageJ fairSIM [82] qui est une implémentation *open source* de l'algorithme proposé par M. Gustaffson [48].

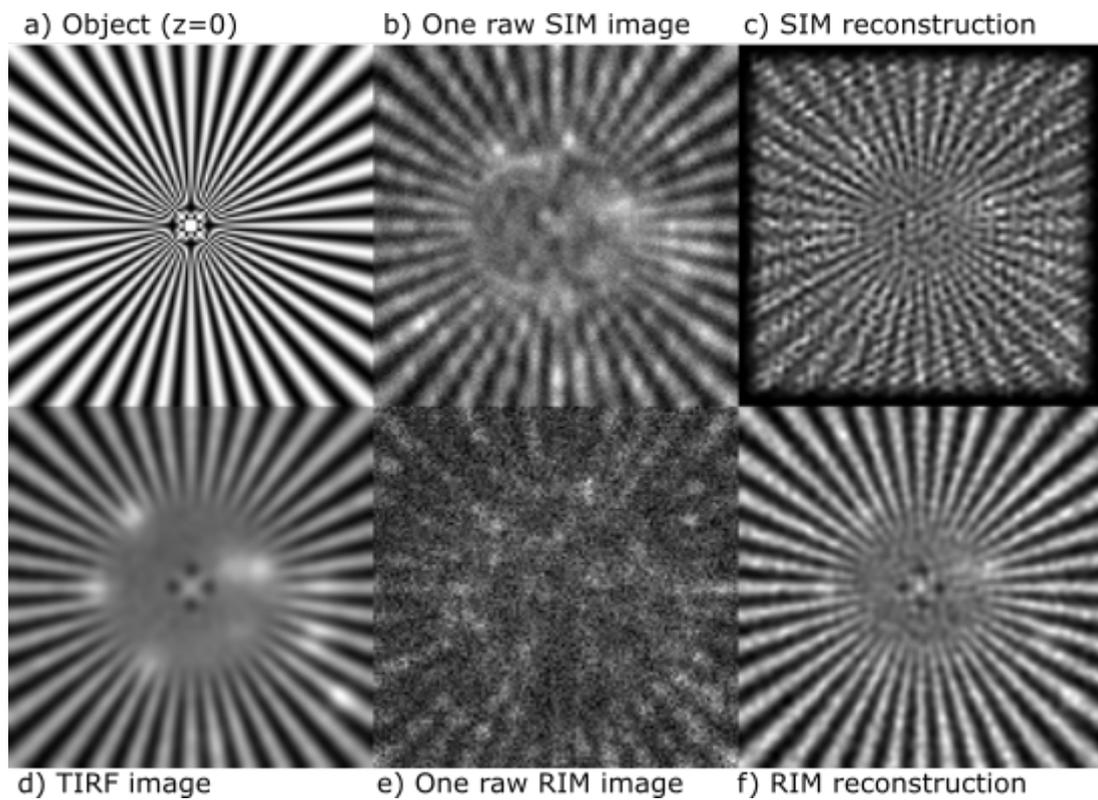


FIGURE 3.11 – TIRF-RIM vs SIM-TIRF avec 5% de fuites. a) Objet dans le plan $z = 0$, b) une image brute SIM, c) reconstruction avec fairSIM, d) image TIRF déconvoluée, e) une image brute RIM, f) reconstruction TIRF-RIM avec algoRIM.

Nous observons que, à 1% de fuites, le pouvoir de résolution de TIRF-RIM est similaire à celui de TIRF-SIM (mais mieux contrasté) et environ deux fois meilleur que celui de TIRF. Cependant, lorsque les fuites augmentent, les reconstructions de TIRF-SIM avec fairSIM ne fonctionnent plus, comme le montre la Figure 3.12, alors que celles du TIRF-RIM restent remarquablement stables.

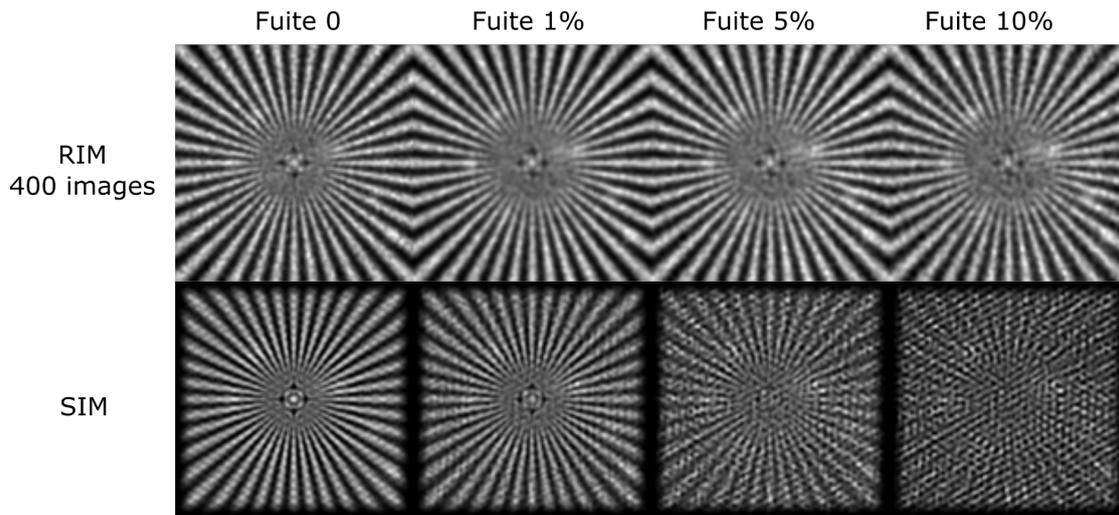


FIGURE 3.12 – Reconstruction TIRF-RIM (ligne 1) et TIRF-SIM (ligne 2) pour différents pourcentages de fuites allant de 0 à 10%.

3.5.2 Décalage de Stokes

Comme nous l'avons mentionné au chapitre 1, pour qu'une reconstruction SIM puisse marcher il est nécessaire de connaître avec précision la position de la grille d'illumination. Lorsque le décalage Stokes est important la grille d'illumination peut vite ne plus être visible sur les images. En effet, pour respecter la condition de réflexion totale, deux faisceaux sont focalisés à la limite de l'ouverture numérique de l'objectif et donc proche de la limite de résolution du microscope à la longueur d'onde d'excitation. La détection se faisant à une longueur d'onde plus élevée et donc avec une limite de résolution plus haute, la grille de lumière est alors fortement atténuée, voir n'est plus visible lorsque le décalage de Stokes est grand, sur les images avec un éclairage structuré.

Ici nous avons donc simulé des données TIRF-RIM et TIRF-SIM avec une longueur d'onde d'excitation fixée à $\lambda_0 = 488nm$ et fait varier la longueur d'onde de détection λ de 525 à 750nm. Le budget de photons est volontairement grand (40000) pour ne pas être limité par un faible rapport signal sur bruit, de même aucune excitation non-évanescence n'a été rajouté. Contrairement aux précédentes simulations, l'échantillonnage est fixé à $\frac{\lambda_0/(4NA)}{2}$ pour que toutes les images aient la même taille de pixel. On peut voir Figure 3.13 que sur les images SIM, la grille de lumière est comme attendue, de moins en moins visible. Les reconstructions avec une longueur d'onde de détection de 525 et 560nm ne sont pas impactés tandis qu'au-delà, à 640 et 750nm l'étoile est déformée à cause d'une mauvaise estimation de la grille. Cela se voit bien sur le motif au centre de l'étoile à 640nm, au centre et en périphérie à 750nm. Les reconstructions TIRF-RIM ne sont elles en aucun cas affectées par la variation de longueur d'onde de détection, mis à part la résolution qui diminue à cause d'une PSF plus large.

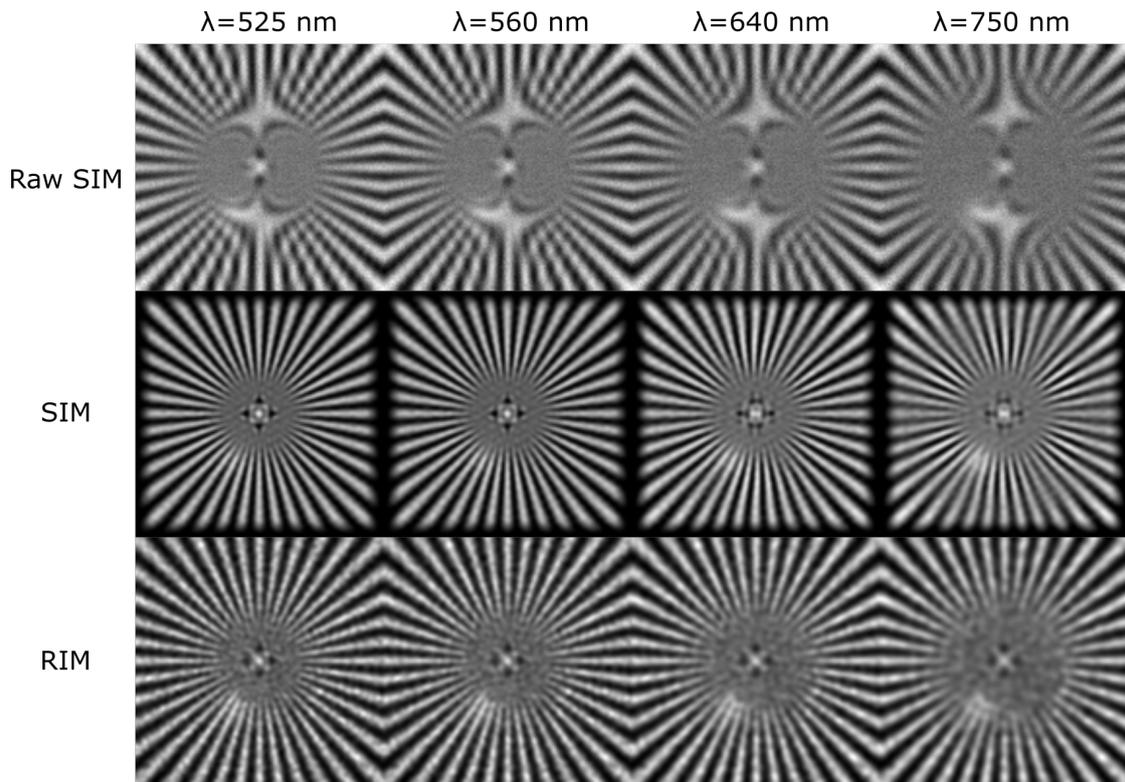


FIGURE 3.13 – Images de l'étoile avec une illumination structurée (ligne 1), reconstructions TIRF-SIM (ligne 2) et TIRF-RIM (ligne 3) pour différentes longueurs d'ondes de détection.

3.6 Conclusion

Dans ce chapitre, nous avons testé sur des données synthétiques les performances et la robustesse du TIRF-RIM sous différentes conditions. Dans un premier temps, nous avons pu confirmer numériquement que la résolution de RIM était améliorée lorsque les speckles utilisés pour éclairer l'objet étaient évanescents. Cela confirme l'hypothèse faite à la fin du chapitre précédent qui supposait que le contenu fréquentiel de la fonction d'autocorrélation des speckles évanescents permettrait d'avoir une meilleure résolution qu'avec des speckles propagatifs. Ensuite, nous avons vu que la différence de la largeur de la PSF entre l'excitation et la détection avait une influence sur le nombre de speckles à utiliser. En calculant le coefficient de variation sur des objets constants puis la fonction erreur sur la mire de résolution après reconstruction, nous avons montré que moins d'illumination sont nécessaires dans le cas des speckles évanescents. Cette propriété est d'une importance majeure pour la mise en œuvre expérimentale du RIM. Avec moins d'images les acquisitions peuvent aller plus vite et permettre de rivaliser avec les performances temporelles du SIM. Enfin, nous avons comparé le TIRF-RIM et le TIRF-SIM sur des objets 3D. Ainsi nous avons pu tester la robustesse des deux techniques vis-à-vis des fuites qui sont toujours présentes

dans les microscopes TIRF. La capacité de sectionnement optique du RIM (grâce à l'utilisation de la variance) permet d'obtenir des reconstructions très peu affectées par la présence des fuites. Les reconstructions SIM faite avec le logiciel fairSIM disponible gratuitement en ligne (comme AlgoRIM) sont en revanche très dégradées ou impossibles au-delà de 5% de fuites. Enfin, nous avons comparé les deux modalités (SIM et RIM) en présence d'un décalage de Stokes et constaté que les reconstructions avec algoRIM n'étaient nullement affectées tandis que les reconstructions avec fairSIM commencent à présenter des aberrations avec un décalage de Stokes supérieur à 150 nm. La robustesse vis-à-vis du décalage de Stokes a son importance, car elle permet avec certain type de fluorophores de faire de l'imagerie en deux couleurs avec une seule longueur d'onde d'excitation.

4 Résultats expérimentaux

Sommaire

4.1	Introduction	94
4.2	Description du montage expérimental	95
4.2.1	Déscription générale	95
4.2.2	Réalisation et alignement du masque	99
4.2.3	Vérification du caractère évanescent des illuminations	102
4.3	Performances du montage	104
4.3.1	Mesure de la PSF	104
4.3.2	Dérive latérale du microscope	106
4.3.3	Uniformité de la détection	107
4.4	Résultats sur échantillons fixes	108
4.5	Résultats sur microscope avec SLM et adapté pour le vivant	112
4.5.1	Description du montage	112
4.5.2	Comparaison RIM, TIRF-RIM et TIRF-SIM	115
4.5.3	Dynamique des podosomes	118
4.6	Préparation des échantillons	122
4.7	Conclusion	122

4.1 Introduction

Dans ce chapitre, nous allons voir des applications du TIRF-RIM sur différents types d'échantillons (calibrés, cellules fixées et vivantes). Dans un premier temps nous allons décrire en détail le montage expérimental développé pendant cette thèse afin de générer des speckles évanescents. Ensuite nous verrons les performances générales du microscope en terme de résolution et de stabilité. Enfin nous présenterons les quelques résultats que nous avons obtenus qui démontre l'intérêt du TIRF-RIM pour des applications en biologie cellulaire. Dans ce chapitre nous montrons que la résolution obtenue en TIRF-RIM est meilleure qu'en RIM classique et inférieure à 90 nm, aussi bien sur échantillons calibrés que sur des cellules vivantes.

4.2 Description du montage expérimental

4.2.1 Description générale

Le montage expérimental (Figure 4.1) pour faire du RIM est très similaire à celui d'un microscope de fluorescence. Nous utilisons comme source d'excitation une diode laser de longueur d'onde 488 nm de chez Oxixius (LBX488). Un diffuseur fixé sur un support de rotation à moteur pas-à-pas (Standa) est positionné dans un plan conjugué avec le plan focal de l'objectif. Une image intermédiaire du diffuseur dans le plan focal objet de la lentille de focalisation L_F est produite par un montage $4f$ avec des doublets achromatiques (lentilles L_1 et L_2). Une lame à retard quart d'onde est positionnée avant le diffuseur pour obtenir une polarisation circulaire et éviter que les grains de speckles ne s'étirent pas dans une direction particulière ce qui aurait pour conséquence la déformation de la fonction d'autocorrélation des speckles. Pour s'assurer que l'illumination soit différente entre chaque image, l'axe de rotation du diffuseur (fixé sur une monture de 1") est écarté le plus possible de l'axe optique. L'objectif de microscope est un objectif à immersion (huile) de grossissement 100X à ouverture numérique 1.49 (Nikon Apo TIRF). L'objectif renvoie l'image de l'objet à l'infinie, elle est ensuite formée par la lentille de tube du microscope sur une caméra sCMOS (Andor Neo 5.5). Un miroir dichroïque permet de séparer le laser d'excitation et la fluorescence. Le miroir dichroïque est associé à un filtre d'excitation qui permet de nettoyer le laser et un filtre d'émission pour la collection du signal de fluorescence. Le support de l'échantillon est lui fixé sur une platine de translation XYZ piezo-électrique PI (non-représenté sur la Figure 4.1).

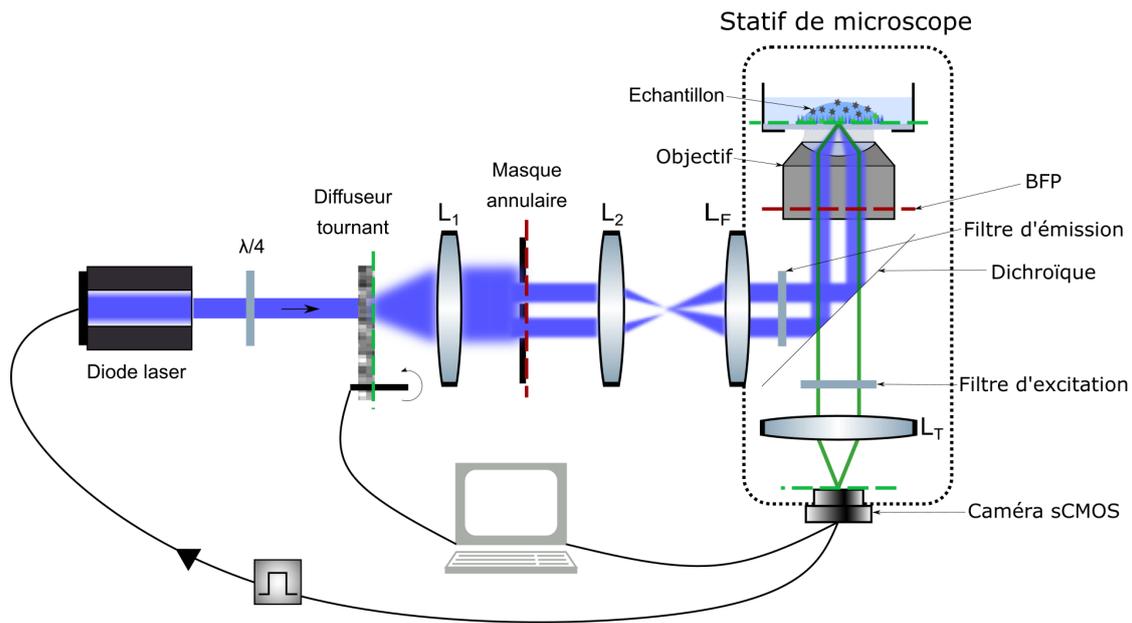


FIGURE 4.1 – Montage expérimental. Une diode laser éclaire un diffuseur monté sur un moteur tournant. Le diffuseur génère un speckle dans le plan focal de l'objectif où se trouve l'échantillon. Un filtre spatial en forme d'anneau coupe les rayons n'étant pas en réflexion totale sur l'interface où se trouve l'échantillon. Les plans indiqués par des pointillés vert sont des plans conjugués avec le plan focal de l'objectif, les rouges avec le plan focal arrière de l'objectif, *Back Focal Plane*, abrégé en BFP. La lentille de tube L_T forme l'image de l'objet dans le plan du détecteur de la caméra sCMOS.

Le système est piloté sur ordinateur par un programme Matlab. Pendant l'acquisition d'une image, le moteur sur lequel est fixé le diffuseur est fixe. Une fois l'image enregistrée le moteur tourne de quelques degrés, s'arrête et donne l'instruction à la caméra de prendre l'image suivante. Pour limiter les problèmes de photo-toxicité et ne pas éclairer inutilement l'échantillon pendant les temps morts de la caméra, le laser est alimenté par un signal TTL (*on-off*) synchronisé sur la caméra. Le temps nécessaire pour une acquisition dépend essentiellement de deux paramètres de la caméra : son temps d'intégration et sa ROI (*Region Of Interest*). La ROI est la taille des images enregistrées, plusieurs ROI sont prédéfinies pour le modèle de notre caméra (pas de ROI personnalisée). Typiquement avec un temps d'intégration de 50ms et une ROI de 528×512 une acquisition prend environ 30 à 40s pour 300 images.

Sans filtre spatial la lumière diffusée par le diffuseur recouvre entièrement le plan focal arrière de l'objectif. Le speckle créé dans le plan de l'échantillon résulte alors de l'interférence d'ondes arrivant sur l'interface avec des angles allant de 0 à l'angle maximum atteignable permis par l'ouverture numérique de l'objectif. Pour créer le speckle évanescant il est nécessaire de filtrer tous les rayons ayant un angle inférieur

à l'angle de réflexion totale de l'interface verre-eau (car les échantillons biologiques ont un indice optique proche de celui de l'eau). Dans le plan focal arrière de l'objectif cela correspond à un disque. Un masque en forme d'anneau inversé (disque central bloquant, couronne transparente) est alors positionné dans un plan conjugué au plan focal arrière de l'objectif comme représenté sur la Figure 4.1.

Pour observer les speckles, nous positionnons à la place de l'objet un miroir métallique puis on retire le filtre d'émission. Sur la Figure 4.2 sont représentés speckles propagatif et évanescent avec leurs transformées de Fourier obtenues en polarisation circulaire et linéaire. On observe qu'en présence d'une polarisation circulaire aucune direction privilégiée n'est visible et les grains de speckles sont isotropes. On constate que les transformées de Fourier des speckles ont les mêmes supports, cependant les hautes fréquences dans le cas propagatif sont atténuées tandis que dans le cas évanescent il y a rebond de l'amplitude juste avant la fréquence de coupure. Ceci explique la différence perçue de la taille des grains de speckle dans les deux modalités, propagatif et évanescent.

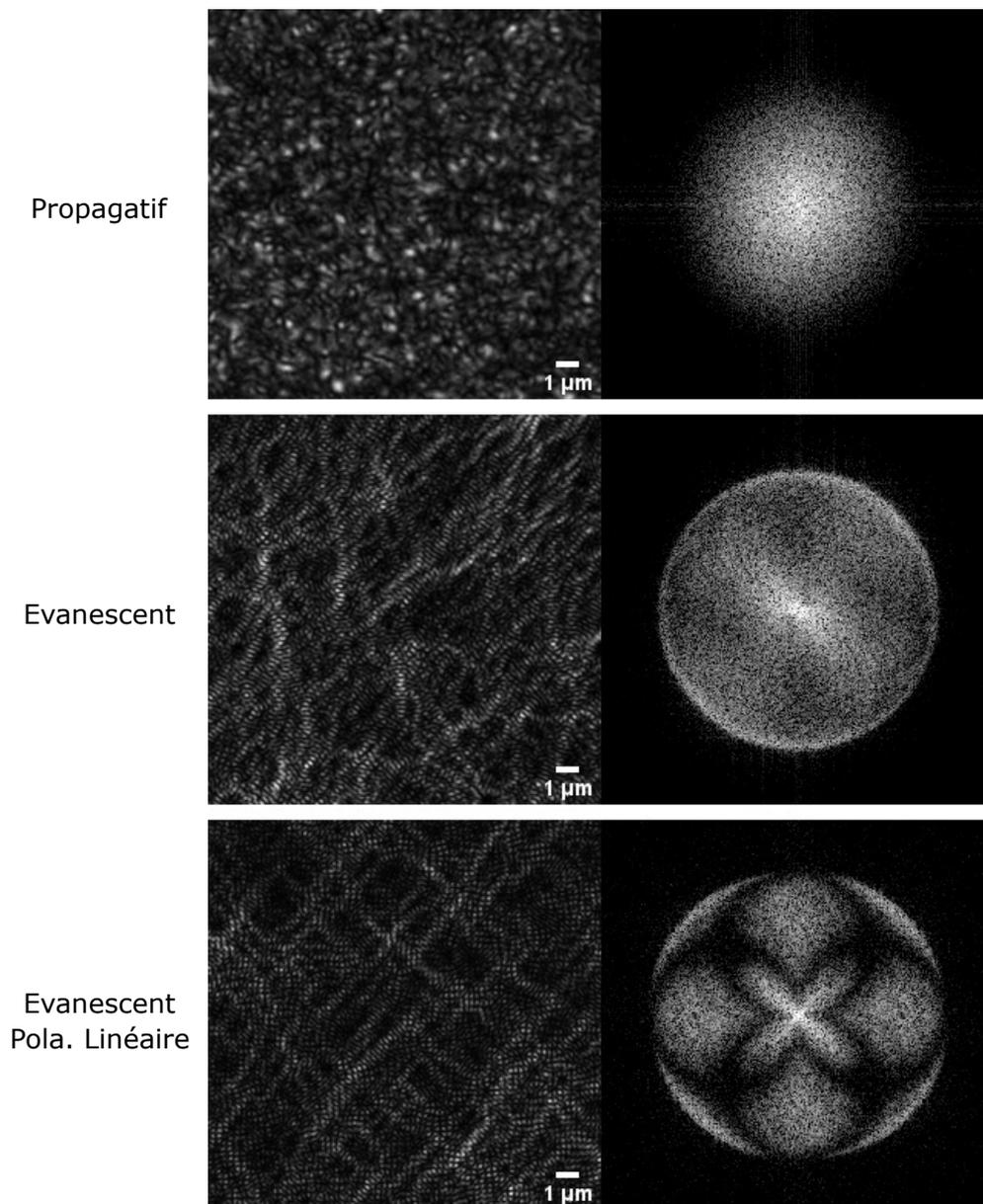


FIGURE 4.2 – Images de speckles obtenues par réflexion sur un miroir situé dans le plan focal de l’objectif. Sur la première colonne sont représentés des speckles obtenus sans masque dans le plan de Fourier et recouvrant donc toute la pupille et évanescents obtenus avec le masque, en filtrant donc les ondes planes n’étant pas en réflexion totale en polarisation circulaire et linéaire. Sur la deuxième colonnes sont représentés les spectres fréquentiels des speckles obtenus par transformée de Fourier.

Nous avons également calculé les fonctions d’autocorrélation des speckles obtenus expérimentalement pour les comparer à celles que nous avons simulées numériquement. Les images des différentes fonctions d’autocorrélation ainsi que leurs spectres

sont comparés sur la Figure 4.3. Les résultats expérimentaux paraissent en accord avec les simulations. On retrouve notamment le pic caractéristique sur le spectre juste avant la fréquence de coupure dans le cas évanescent. On note néanmoins, dans l'espace direct, que l'autocorrélation expérimentale du speckle propagatif est un peu plus large que la simulation et que le lobe secondaire n'est plus visible. Ceci est probablement dû aux imperfections de la pupille de l'objectif qui atténuent plus les hautes fréquences.

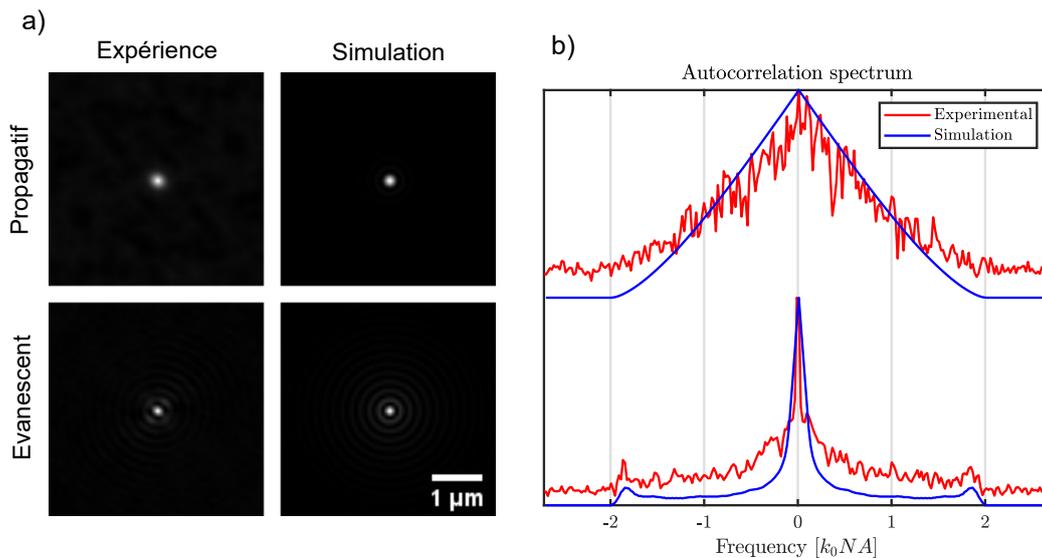


FIGURE 4.3 – Comparaisons des fonctions d'autocorrélation des speckles. a) Auto-corrélation d'un speckle propagatif obtenue expérimentalement et par simulation (ligne 1). Même chose dans le cas d'un speckle évanescent (ligne 2). b) Comparaison simulation/expérience des profils d'intensité du spectre de la fonction d'autocorrélation du speckle propagatif et évanescent.

4.2.2 Réalisation et alignement du masque

Pour produire des speckles évanescents nous devons réaliser un masque en forme d'anneau qui devra être positionné dans un plan conjugué au plan focal arrière de l'objectif (plan de Fourier). La première étape consiste donc à déterminer les dimensions de l'anneau. Dans un premier temps, nous avons essayé d'estimer ses dimensions par dichotomie en faisant des masques de différentes tailles. Il s'est avéré rapidement qu'il était nécessaire de connaître avec beaucoup plus de précision la taille de la pupille de l'objectif. Pour ce faire nous avons cherché un moyen d'imager la pupille de l'objectif. Nous avons donc inséré dans le statif du microscope une lentille supplémentaire L_S entre l'objectif et la lentille de tube L_T du microscope comme indiqué sur la Figure 4.4, de sorte que la pupille se trouve dans le plan focal objet de L_S . L'image de la pupille est donc renvoyée à l'infini et la lentille de tube forme ensuite son image dans le plan

de la caméra.

Dans cette configuration, si l'on éclaire toute la pupille de l'objectif et que l'on retire le filtre d'émission, les rayons incidents du laser arrivent sur l'interface du verre avec tous les angles permis par l'ouverture numérique de l'objectif. Les rayons avec un angle inférieur à l'angle de réflexion totale s'échappent tandis que les autres sont renvoyés vers la caméra. Sur la Figure 4.4 sont représentées deux images du plan focal arrière de l'objectif lorsque l'échantillon placé dans le plan focal de l'objectif est l'interface d'une lamelle de verre. Comme indiqué sur la figure, une image correspond à l'observation de l'interface verre-air, la seconde verre-eau. On observe dans les deux cas un anneau brillant correspondant aux rayons réfléchis par la réflexion totale à l'interface. Le rayon externe est toujours le même et correspond à l'ouverture numérique de l'objectif. Le rayon interne correspond quant à lui à l'angle de réflexion totale verre-air et verre-eau respectivement.

La focale de la lentille L_S étant la même que la lentille de tube ($20cm$) le grandissement de l'image vaut 1. Connaissant la taille des pixels de la caméra ($6.5\mu m$) nous pouvons en déduire les dimensions du domaine correspondant à la réflexion totale. On définit R_{int} , R_{ext} comme les rayons interne et externe de l'anneau de réflexion totale respectivement et $e = R_{ext} - R_{int}$ son épaisseur. Dans le cas verre-eau on trouve $R_{int} = 2.55mm$, $R_{ext} = 3.02mm$, soit $e = 477\mu m$. Enfin nous devons tenir compte du grandissement entre la position du masque et son image dans le plan focal arrière de l'objectif. Les lentilles L_2 et L_T (Figure 4.1) sont de focales 400 et $300mm$ respectivement ce qui correspond à un grandissement de $3/4$. Nous devons donc concevoir un anneau dont les dimensions sont multipliées d'un facteur $4/3$ pour compenser le grandissement de l'association de L_2 et L_T .

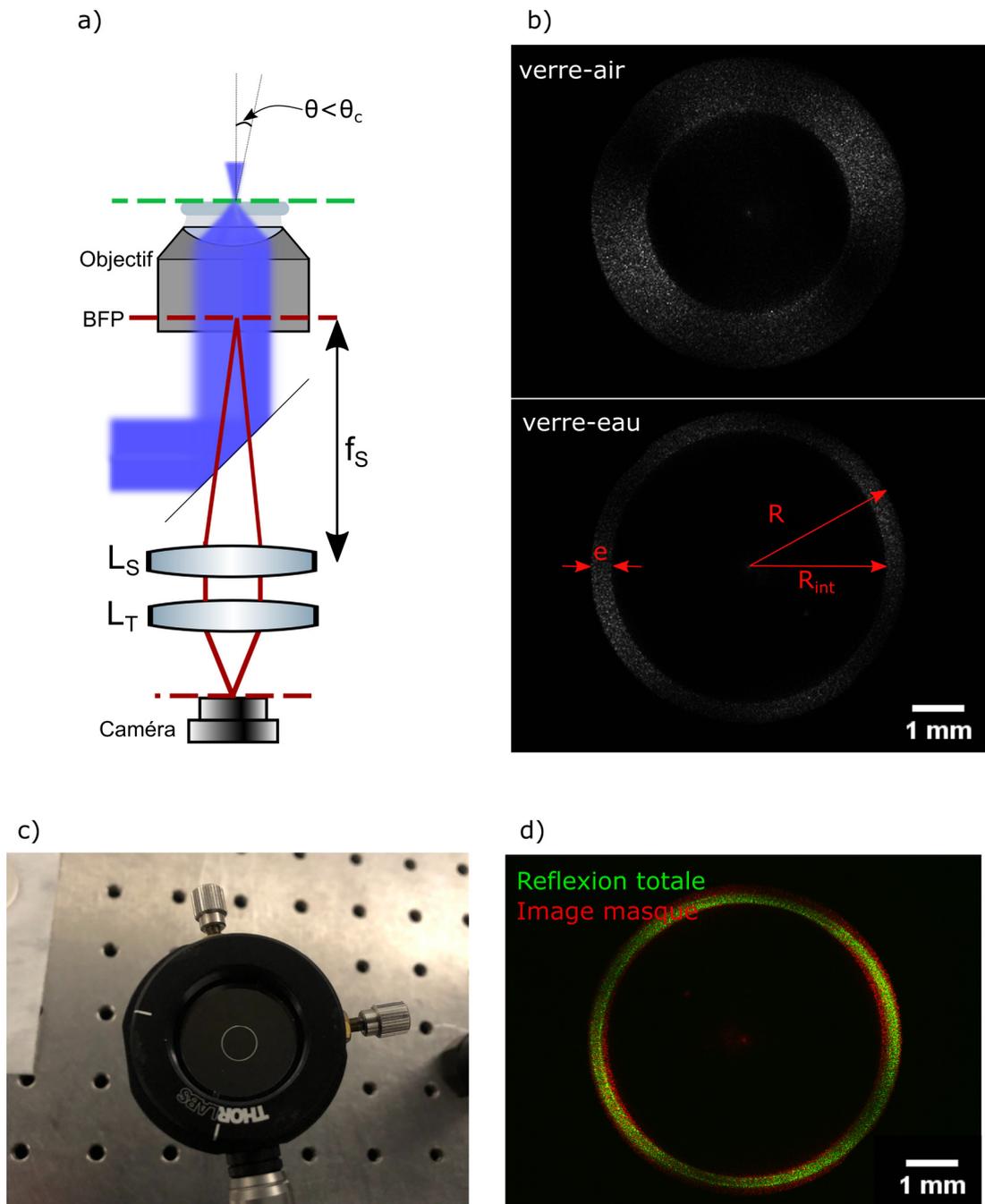


FIGURE 4.4 – Observation de la pupille de l’objectif. a) Schéma (pas à l’échelle) du montage expérimental modifié où toute la pupille de l’objectif est éclairée. Une lentille supplémentaire L_S est insérée dans le statif du microscope pour faire l’image de plan focal arrière de l’objectif (BFP). Les rayons incidents avec un angle inférieur à θ_c sont transmis, ceux supérieurs à θ_c sont réfléchis et forment un anneau sur la caméra. b) Image obtenue lorsque dans le plan focal se trouve une interface verre-air et air-eau. Le grandissement entre la pupille et la caméra est connu et permet donc de déterminer les dimensions de l’anneau de réflexion totale. c) Photographie du masque sur sa translation $x - y$. d) Image du masque (vert) superposée à l’image du plan focal arrière (rouge).

Les dimensions requises pour le masque étant très spécifiques, nous n'avons rien trouvé dans le commerce et nous avons donc dû le fabriquer nous même. Plusieurs méthodes ont été explorées pour sa réalisation. Dans un premier temps, nous avons pensé imprimer un disque à l'impression 3D, à priori le plus simple pour bloquer les rayons qui ne sont pas en réflexion totale. Malheureusement il s'est avéré qu'éclairer le bord extérieur de la pupille de l'objectif ne permettait d'obtenir des éclairissements évanescents. Nous pensons que cela est dû aux imperfections de l'objectif dans cette région ainsi qu'aux bords métalliques réfléchissants. Nous l'avons alors imprimé en deux pièces séparées (un disque bloquant et une ouverture circulaire plus large) que nous avons collées sur une lamelle de verre, mais la précision requise et les irrégularités dues à l'impression 3D ne nous ont pas permis d'obtenir le résultat escompté. Nous avons également essayé de construire des masques avec du scotch métallique découpé manuellement qui permettait d'obtenir des bords plus réguliers, mais encore une fois nous étions confrontés à trop peu de précision. La méthode que nous avons retenue a consisté à ablater la surface réfléchissante de miroirs métalliques sur des substrats transparents. L'ablation est faite par impulsions laser infrarouge orientées par des miroirs galvanométriques¹. Une fois terminé, le masque est monté sur une translation $x - y$ dans le plan focal de la lentille L_1 , plan trouvé par autocollimation. Pour l'aligner correctement nous faisons avant chaque expérience une image de la pupille sans le masque avec comme objet une lamelle de verre sur laquelle a été déposée une goutte d'eau. Cette image est enregistrée et est superposée avec le live de la caméra. Le masque est positionné de sorte que son image (anneau) soit parfaitement incluse dans l'anneau correspondant à la réflexion totale, Figure 4.4.

4.2.3 Vérification du caractère évanescent des illuminations

Une fois le montage terminé, nous avons dû vérifier que les éclairissements ainsi créés étaient bien évanescents. Pour cela, plusieurs expériences ont été menées. La plus simple a été de simuler (expérimentalement) des images en champ clair de billes de verre diffractantes d'indice $n_{bille} = 1.51$. Pour cela nous faisons la moyenne de 300 images avec des éclairissements de speckles et nous retirons le filtre d'émission pour collecter la lumière diffractée par l'objet. Sur la Figure 4.5 est représentée l'observation d'une bille de $6\mu m$ de diamètre avec des éclairissements de speckles propagatifs et évanescents. Dans le cas propagatif le plan focal se situe au centre de la bille, on observe la bille brillante qui est due à l'excitation rétro-diffusée sur fond sombre. On peut en mesurer expérimentalement son diamètre, mesure en accord avec le diamètre donné par le fabricant. Dans le cas évanescent on observe une tache noire au centre de l'image. Cette tache correspond à la lumière évanescente convertie en lumière propagative à cause du contraste d'indice entre l'objet et le milieu d'immersion ($n_{bille} > n_{eau}$), lorsque la surface de la bille est en proche contact avec l'interface de verre sur laquelle elle est déposée. Cette observation est en accord avec celle obtenue par [12] dans une

1. L'ablation a été faite par Laurent Gallais, professeur des universités à l'Institut Fresnel, sur une de ses expériences.

expérience similaire.

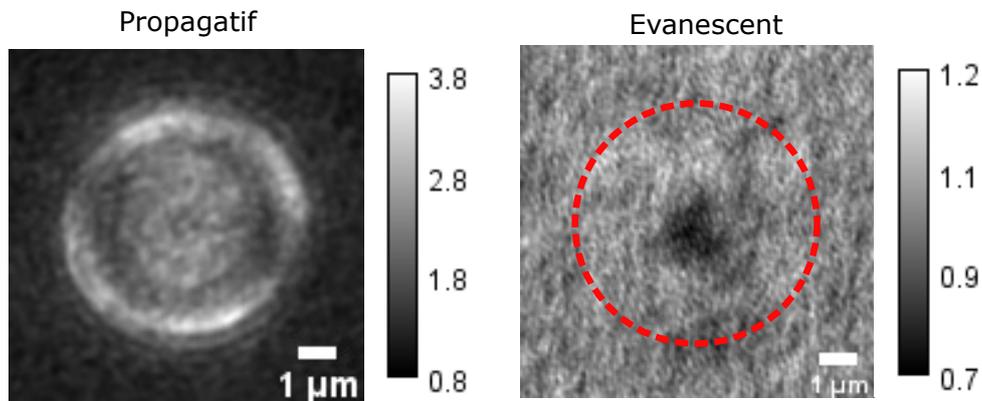


FIGURE 4.5 – Moyenne des images de diffraction obtenues avec des éclairagements de speckles propagatifs et évanescents. Dans le cas propagatif l'image est prise au centre de la bille et nous permet de retrouver son diamètre ($6\mu m$). Dans le cas évanescent l'image est faite au niveau de l'interface. On observe un fond clair correspondant à l'excitation réfléchié à l'interface et une tache sombre au centre, où la bille est en proche contact de l'interface. Le champ évanescent est converti en champ propagatif et ne revient pas sur la caméra. La circonférence de la bille mesurée avec l'image obtenue avec les speckles propagatifs est indiquée en pointillés rouges.

Une seconde expérience a été conduite dans le but de vérifier le caractère évanescent des speckles. Celle-ci consistait à fixer des billes fluorescentes à distance contrôlée de l'interface à observer. Dans cette expérience, nous fixons des billes fluorescentes de $100nm$ de diamètre sur une lamelle de verre qui sera l'interface à observer. Sur une autre lamelle on fixe de plus grosses billes, $2\mu m$ de diamètre, que l'on retourne sur la première. Initialement cette expérience avait plusieurs objectifs. Dans un premier temps, nous espérons pouvoir rapprocher suffisamment les billes de $2\mu m$ de l'interface où sont générés les speckles évanescents. D'abord pour estimer leur profondeur de pénétration, mais aussi estimer le pouvoir de sectionnement supplémentaire apporté par la reconstruction RIM. Dans un second temps, nous souhaitons rajouter dans la préparation des échantillons de billes, des billes de verre non-fluorescentes dans le but de créer artificiellement des fuites de lumière suffisamment intenses pour exciter les billes fluorescentes en suspension au-dessus de l'interface à observer. En pratique, il n'est physiquement pas possible de rapprocher les deux interfaces à moins de quelques microns l'une de l'autre à cause des répulsions électrostatiques et de la planéité des surfaces de verre qui ne sont pas parfaites. Il n'a donc pas été possible d'estimer la profondeur de pénétration des speckles évanescents de cette façon. En revanche nous avons pu vérifier que l'on obtenait les mêmes performances que le "vrai" TIRF en comparant avec la moyenne des images de speckle.

Le vrai TIRF, c'est à dire le TIRF obtenu à partir d'une seule onde plane incidente en réflexion totale à l'interface, a été réalisé en créant une dérivation du laser d'excitation à l'aide d'un cube séparateur polarisant. Le cube est placé avant le diffuseur et associé à une lame demi-onde. La lame demi-onde permet de faire passer toute l'intensité du laser soit vers le diffuseur, soit vers la voie d'illumination TIRF. Avec un miroir situé dans un plan conjugué au plan focal de l'objectif, nous pouvons ainsi contrôler l'angle d'illumination pour faire des images TIRF sans changer le champ de vue. Le schéma du montage est représenté Figure 4.6, dans cette configuration, nous pouvons alors passer rapidement d'une illumination à une onde plane (épi-illumination, TIRF ou position intermédiaire) à une illumination de speckle simplement en faisant tourner la lame demi-onde.

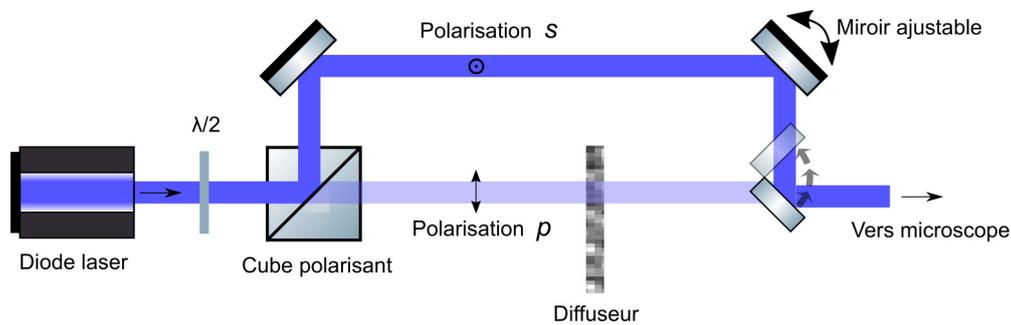


FIGURE 4.6 – Dérivation pour contrôler l'illumination. À l'aide d'une lame demi-onde et d'un cube séparateur polarisant, le laser peut être dirigé vers le diffuseur pour créer l'illumination de speckle ou vers le miroir ajustable pour une illumination de type onde plane.

4.3 Performances du montage

4.3.1 Mesure de la PSF

Avant de mesurer la PSF, nous devons vérifier que nous sommes capable de l'échantillonner correctement. A la longueur d'onde de détection $\lambda = 525\text{nm}$ et avec une ouverture numérique de 1.49, on rappelle que la limite de résolution selon le critère de Rayleigh est $\delta = 215\text{nm}$ soit une fréquence de coupure $\nu_c = 4.65\mu\text{m}^{-1}$. Pour échantillonner correctement la PSF, la taille des pixels doit respecter le théorème de Nyquist-Shannon qui stipule que la fréquence d'échantillonnage doit être au moins deux fois supérieur à la fréquence du signal observé. La taille des pixels de notre caméra est $6.5\mu\text{m}$, avec un grandissement 100X de l'objectif, cela fait 65nm soit une fréquence d'échantillonnage de $\nu_e = 15.4\mu\text{m}^{-1} > 2\nu_c$ ce qui respecte bien le critère de Nyquist-Shannon.

Un paramètre important dans une expérience de microscopie est la largeur de la PSF d'observation de l'objectif utilisé. Dans notre montage nous utilisons un objectif Nikon ApoTIRF à immersion (à huile) d'ouverture numérique 1.49, nous avons donc

une résolution théorique de 215 nm à la longueur d'onde $\lambda = 525\text{nm}$ selon le critère de Rayleigh. Une bonne connaissance de la taille de notre PSF nous permettra d'estimer le gain de résolution latérale apporté par le RIM.

Pour estimer la PSF nous faisons une image de billes fluorescentes de 100 nm de diamètre avec une illumination uniforme. Numériquement nous mesurons la position de chaque bille présente dans l'image puis chacune des billes est ajustée par une gaussienne symétrique à deux dimensions. Pour éviter un biais, nous avons soustrait à l'image de billes une image prise dans le noir, sans objet, dans les mêmes conditions. En effet, même sans signal de fluorescence le niveau de la caméra n'est pas nul à cause de l'agitation thermique. On approxime alors la largeur de PSF par la largeur à mi-hauteur de la gaussienne. Ce travail a été fait avec le plugin ThunderSTORM [84] du logiciel libre de traitement d'images Fiji. ThunderSTORM est un programme prévu pour les reconstructions d'images PALM/STORM. Il retourne une liste avec les coordonnées et la largeur de toutes les billes détectées sur notre image. Les billes les moins brillantes ainsi que celles trop intenses ont été filtrées. De même celles trop éloignées de l'axe optique sont filtrées pour rejeter celles ayant potentiellement subi des aberrations ($< 40\mu\text{m}$ du centre de la caméra). Un exemple d'image de billes est présenté sur la Figure 4.7, les billes détectées sont marquées d'un point rouge. Est également représentée sur la Figure 4.7 la transformée de Fourier de l'image de billes. Cela nous donne une première estimation de la résolution de l'objectif en mesurant le rayon du support de l'OTF. On trouve environ 280 nm mais la démarcation n'étant pas nette cette mesure reste peu précise. La distribution des tailles de billes est également représentée, la largeur de la PSF est alors estimée comme étant la médiane (on choisit la médiane, car la distribution est asymétrique) qui est de $292 \pm 14\text{nm}$. L'incertitude est ici l'écart-type de la distribution, sur un échantillon de 610 détections.

Cette taille de PSF est surprenante pour un objectif avec une telle ouverture numérique (1.49). C'est 35% de plus que la valeur théorique de 215 nm. En premier lieu, nous avons pensé que cela était dû à la largeur de 100 nm des billes utilisées. Les billes n'étant pas ponctuelles et même comparables à la résolution attendue (seulement d'un facteur 2 plus petite environ), il est possible de penser que la limite de résolution soit surestimée. Pour le vérifier nous avons simulé l'image d'une bille de 100 nm de diamètre et comparé son profil d'intensité (voir Figure 4.7) à celui d'une PSF obtenue avec une ouverture numérique de 1.49. Les deux sont très comparables, la taille finie des billes ne semble pas expliquer cette largeur de PSF de 292 nm. Une autre possibilité que nous avons envisagée était un éventuel *mismatch* entre l'indice optique du verre et de l'huile utilisée, mais cette hypothèse a finalement été rejetée. Une autre explication possible peut être la longueur d'onde de fluorescence des billes utilisées. En effet la fluorescence n'est pas monochromatique, leur spectre présente une longue "queue" allant vers des longueurs d'ondes plus grandes. Cet écart avec la résolution théorique a déjà été observé sur des objectifs à grande ouverture numérique [19, 36, 79]. Les raisons invoquées sont les mêmes que mentionnées plus haut. L'explication la plus plausible serait une forte atténuation des rayons marginaux aux bords de la pupille de l'objectif.

Malgré la mauvaise résolution de l'objectif, nous allons néanmoins montrer par la suite la capacité du RIM à améliorer la résolution latérale des images de fluorescence.

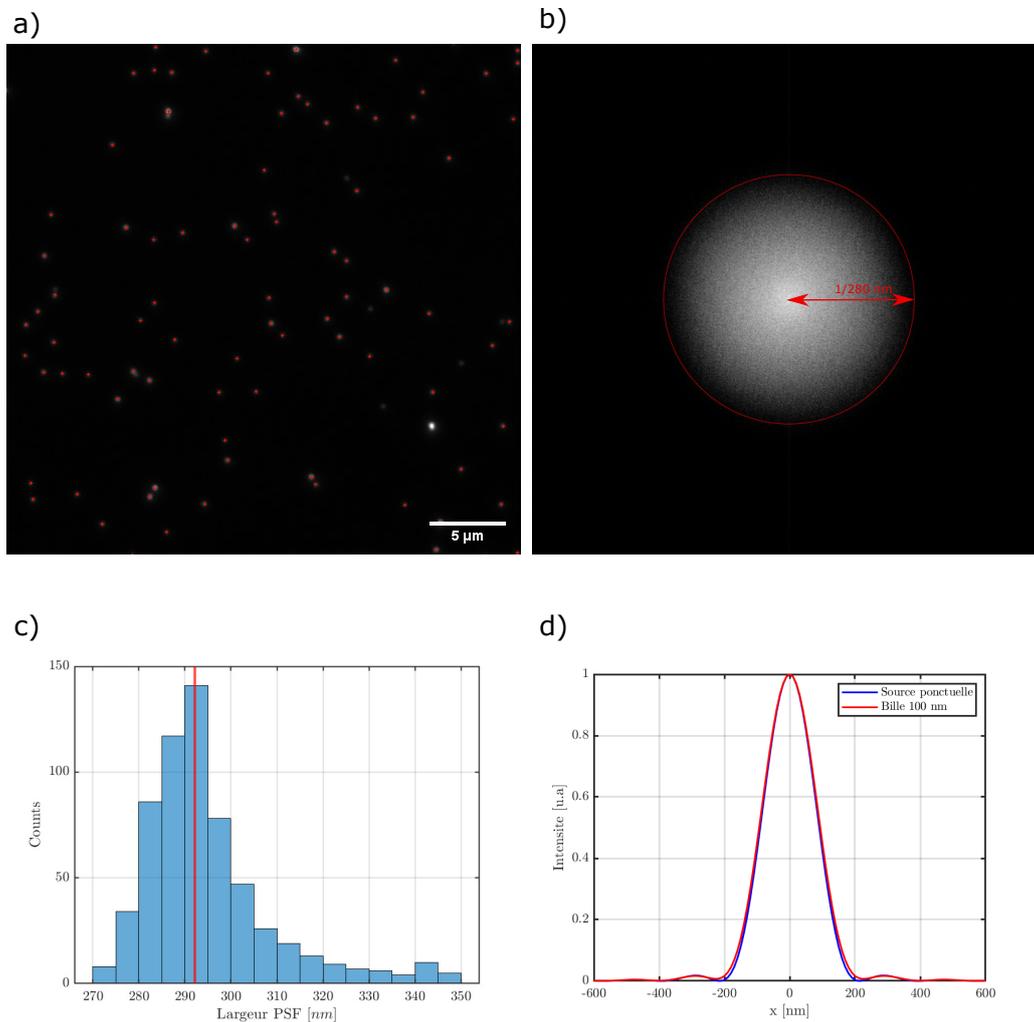


FIGURE 4.7 – Estimation de la PSF. a) Image de billes fluorescentes de 100 nm de diamètre. Sont indiquées en rouges celles détectées qui n'ont pas été filtrées. b) Transformée de Fourier de a), le rayon du support de l'OTF peut être estimé à environ $1/280\mu m^{-1}$. c) Distribution de la largeur à mi-hauteur des billes détectées, la médiane indiquée en rouge se trouve à 292 nm et l'écart-type est de 14 nm (échantillon de 610 billes). d) Simulation comparant le profil d'intensité d'une PSF idéale (source ponctuelle) et de l'image d'une bille de 100 nm.

4.3.2 Dérive latérale du microscope

Les mesures de RIM sur notre montage étant relativement longues (de 30s à 1min 30s pour les plus longues), il est important de s'assurer que l'objet ne se déplace pas

latéralement entre le début et la fin de l’acquisition. Pour cela nous utilisons une nouvelle fois des billes fluorescentes et le logiciel ThunderSTORM [84] . Cette fois ci nous faisons des images d’une seule bille avec une fréquence de 1Hz pendant 10 min. Sur chaque image ThunderSTORM mesure la position de la bille. La précision de localisation évolue comme $1/\sqrt{N}$ où N est le nombre de photons collectés. Les billes fluorescentes étant très brillantes ($\approx 1e5$ photons) la précision de détection est alors inférieure à quelques nanomètres.

Les résultats sont représentés sur la Figure 4.8. Nous pouvons constater qu’à l’échelle d’une minute, temps moyen d’une acquisition sur ce montage, la dérive latérale est de l’ordre de la dizaine de nanomètres. Cette dérive est négligeable devant la résolution du microscope (presque 300 nm) et de la résolution attendue après reconstruction. Cette dérive ne sera donc pas problématique pour nos expériences sur des échantillons fixés. Dans le cas contraire, nous devrions envisager de recalibrer les images à l’aide d’un marqueur (comme une bille fluorescente) ou bien par une méthode d’autocorrélation comme cela est fait dans les expériences de SMLM [30].

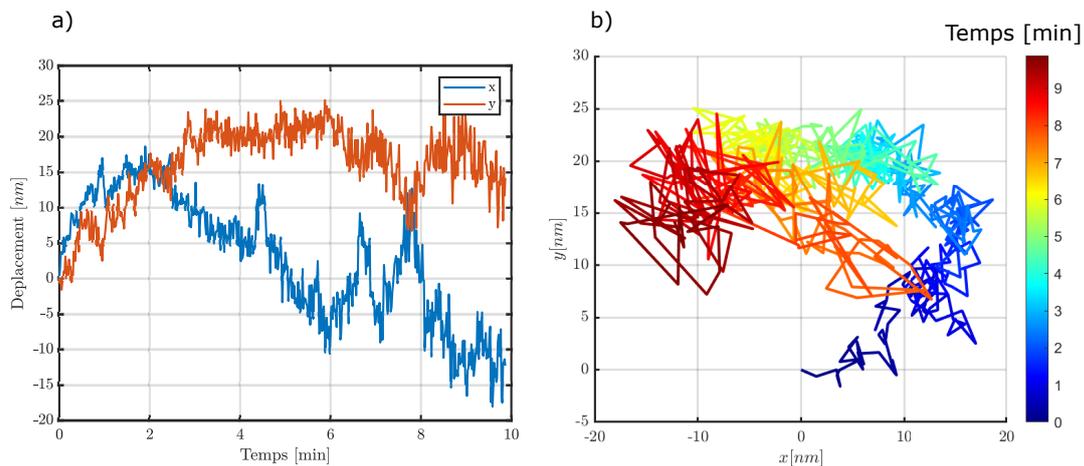


FIGURE 4.8 – Dérive latérale du microscope. a) Déplacement de la bille selon les axes x et y en fonction du temps. b) Trajectoire de la bille dans le plan $x - y$

4.3.3 Uniformité de la détection

Lorsque nous avons travaillé sur des échantillons biologiques, même avec de faibles intensités d’excitation, le photo-blanchiment était un paramètre critique à prendre en compte. Comme décrit dans la section 4.2.1, lorsque le diffuseur est en rotation entre chaque image, l’échantillon est exposé inutilement au rayonnement du laser d’excitation. Pour remédier à cela nous avons synchronisé le laser sur la caméra pour que celui-ci excite la fluorescence de l’échantillon uniquement quand la caméra est en train d’acquérir une image. Le modèle de notre caméra (Andor Neo 5.5 sCMOS de 2011) n’a pas de mode d’acquisition en *global shutter*. Lorsqu’une caméra fonctionne avec le *global shutter* toutes les rangées de pixels sont exposées puis lues simultanément.

ment. A l'inverse pour le *rolling shutter*, unique mode de fonctionnement de notre caméra, l'exposition puis la lecture de chaque rangée de pixel est différée. La durée entre le début de l'exposition de la première rangée et le début de l'exposition de la dernière rangée est de 10 ms sur notre modèle. Le laser étant synchronisé sur un signal déclenché par le début de l'exposition de la rangée 1 (rangée au centre de la caméra), cela signifie que les rangées aux extrémités auront été exposées 10ms de moins que la première. Le principe de fonctionnement du *rolling shutter* est résumé Figure 4.9. Sur des échantillons biologiques fixés, nous préférons donc utiliser de longs temps d'intégration (100 – 200ms) et une faible puissance d'excitation que de chercher à optimiser le temps d'acquisition en réduisant le temps d'intégration de la caméra.

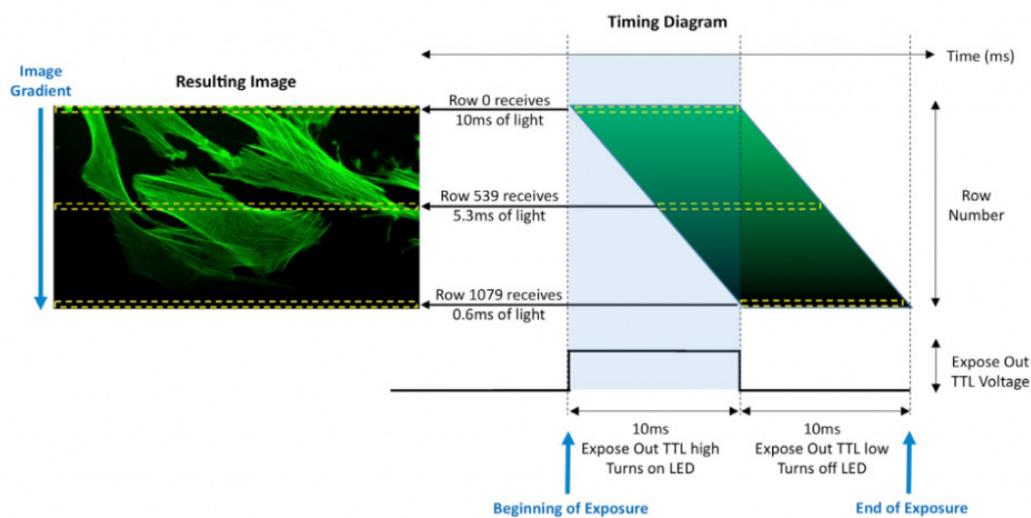


FIGURE 4.9 – Fonctionnement du *rolling shutter*. À cause du temps de lecture de la caméra, la dernière rangée de pixels est moins exposée que la première. Cela a pour effet de créer un gradient d'intensité sur l'image.

4.4 Résultats sur échantillons fixes

Ce montage avec diffuseur nous a permis de tester les performances du TIRF-RIM en termes de résolution et sectionnement optique. La résolution a pu être testée sur une mire calibrée Argolight. Argolight est un fabricant de matériel de test et de calibration pour microscopes optiques. La lamelle Argo-SIM est une lame de verre contenant différents motifs fluorescents incrustés dans le verre à 100 nm de l'interface. Le motif qui nous intéresse est constitué de 14 paires de lignes parallèles espacés de 0 à 390 nm par pas de 30 nm. On notera que le motif étant incrusté dans du verre, il n'est pas possible de vérifier les conditions de réflexion totale, seule la résolution pourra être testée.

Sur la Figure 4.10 est représentée une image déconvoluée du motif obtenue avec une illumination homogène. Les lignes séparées de 300 nm sont bien résolues, mais celles

séparées de 270 nm ne sont plus distinguables. Cela confirme le résultat que nous avons obtenu sur la largeur de la PSF de notre objectif de microscope. Pour rappel nous avons estimé une résolution de 292 nm. Sur la même Figure est représentée une reconstruction obtenue avec 300 éclairagements de speckles pseudo-évanescents. Sur cette image les lignes séparées de 150 nm sont résolues ce qui confirme expérimentalement la capacité du RIM à améliorer la résolution d'un facteur 2.

Une fois cette première validation obtenue, nous avons alors testé notre montage sur des cellules fixées. Les cellules sont immergées dans l'eau pour reproduire les conditions du vivant et confirmer l'efficacité du TIRF-RIM, conçu pour produire des speckles évanescents à l'interface verre-eau. Les échantillons que nous avons observés sont des cellules COS-7 sur lesquelles nous avons marqué le réseau de filaments d'actine avec une GFP (Alexa488). Sur la Figure 4.10 sont représentées une image brute obtenue avec un éclairage de speckle évanescent, une image TIRF déconvoluée et une reconstruction. La résolution est, comme pour la mire, améliorée d'un facteur deux comme le montre le profil d'intensité. On peut également constater sur la reconstruction que le fond résiduel fluorescent présent sur l'image TIRF a complètement été supprimé et donc le contraste est grandement amélioré.

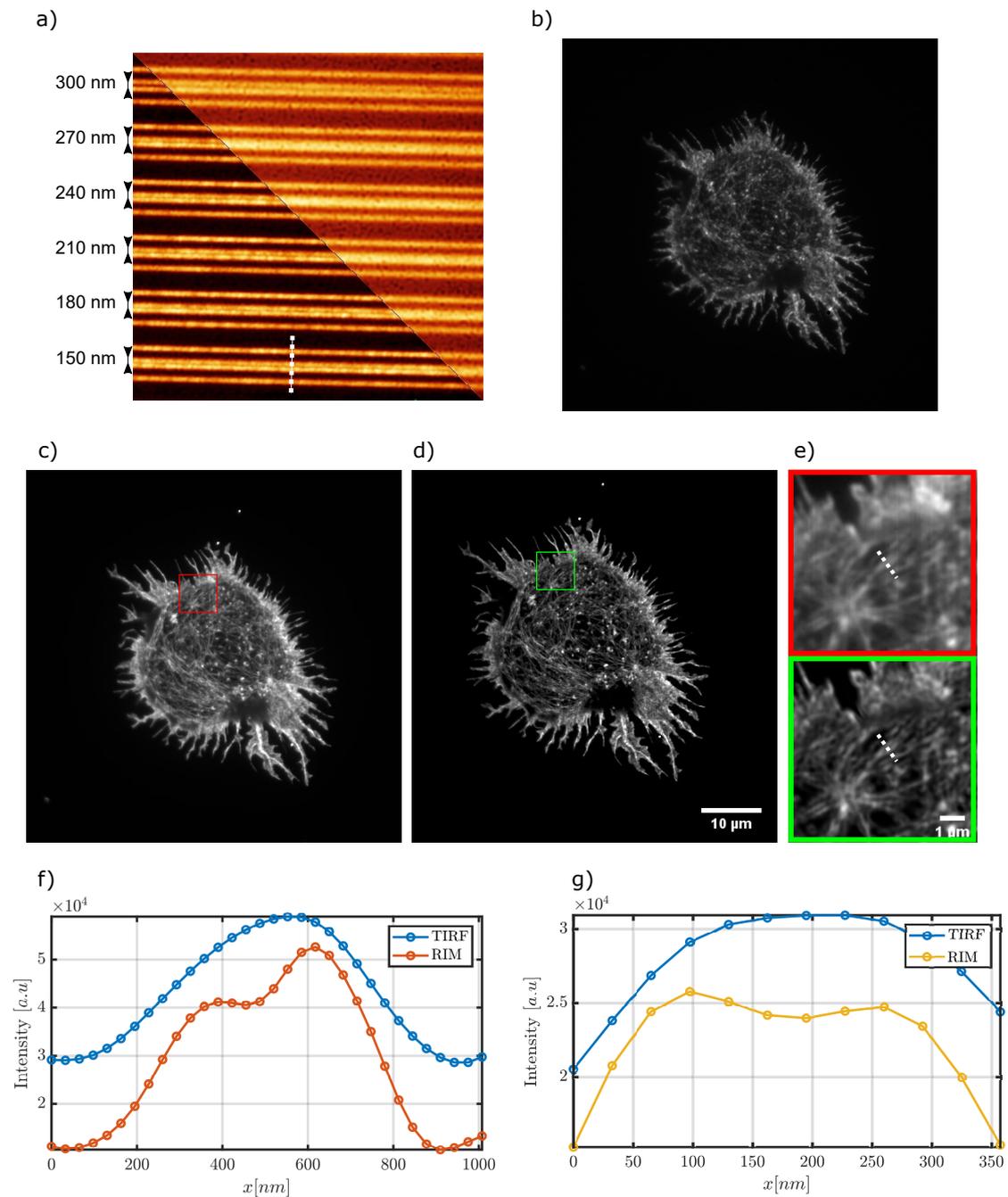


FIGURE 4.10 – a) Image plein champ et reconstruction TIRF-RIM sur la mire Argolight. En plein champ les lignes espacées de 300 nm sont discernables mais pas celles de 270 nm. Les lignes séparées de 150 nm sont bien résolues après la reconstruction TIRF-RIM. b) Une image brute de speckle d'une cellule COS-7 dont l'actine a été marquée par Alexa488. c) et d) images plein champ et reconstruction TIRF-RIM de la même cellule qu'en a). e) Zoom sur les régions encadrées en c) et d). f) Profil d'intensité le long des pointillés sur les lignes espacées de 150 nm de a). g) Profil d'intensité le long des pointillés de d).

Plusieurs acquisitions ont été faites dans les mêmes conditions sur différentes cellules pour vérifier la répétabilité des mesures. Nous avons systématiquement pu comparer les images TIRF et les reconstructions TIRF-RIM et constater que le contraste et la résolution transverse étaient systématiquement améliorés (Figure 4.11). Une fois assuré d'avoir un protocole fiable, qui fonctionne sur des échantillons calibrés (mire Argolight) et biologiques dans des conditions comparables aux conditions réelles, nous avons alors essayé de l'appliquer sur des échantillons vivants.

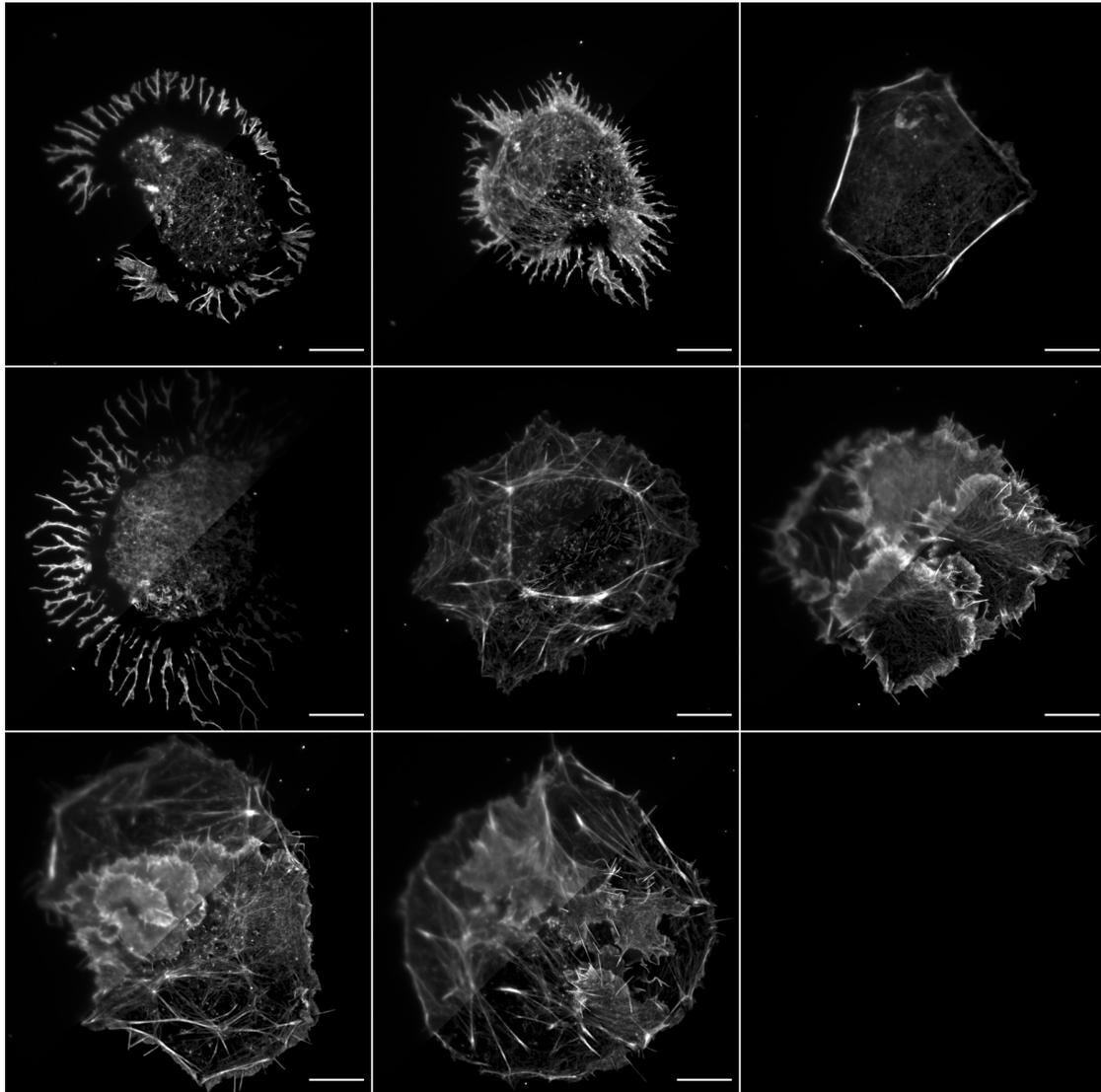


FIGURE 4.11 – Exemples de résultats sur cellules fixées (COS-7 actine marquée avec Alexa488). Triangles supérieurs : images TIRF déconvoluées. Triangles inférieurs : reconstruction TIRF-RIM. Echelle $10\mu m$

4.5 Résultats sur microscope avec SLM et adapté pour le vivant

4.5.1 Description du montage

Nous avons jusqu'ici décrit en détails le microscope développé pendant ce travail de thèse à l'Institut Fresnel exploitant des speckles générés par un diffuseur. Cela nous a permis de réaliser une preuve de principe du fonctionnement du TIRF-RIM sur des échantillons calibrés (mire Argolight) pour tester la résolution et sur des échantillons biologiques fixés. Pour aller plus loin, nous aimerions pouvoir faire de l'imagerie super-résolue sur des cellules vivantes. Malheureusement, notre microscope n'est pas équipé pour recevoir un échantillon sous atmosphère contrôlée (humidité, température). De plus la configuration avec un diffuseur sur moteur tournant ne permet pas d'avoir une résolution temporelle suffisante.

Le RIM utilisant des speckles propagatifs avait déjà été réalisé par Thomas Mangeat au Centre de Biologie Intégrative de Toulouse (Mangeat 2021). Lors d'une mission pendant l'été 2021, nous avons ensemble modifié son montage pour l'adapter à la configuration TIRF utilisant un SLM (*Spatial Light Modulator*) permettant de changer l'illumination suffisamment vite pour faire des acquisitions sur du vivant. Un schéma du montage est présenté Figure 4.12 et est constitué des éléments suivants. Un combinateur laser à fibre avec 4 lasers rapides à diode (Oxxius) avec des longueurs d'onde respectives de 405 nm (LBX-405-180-CSB), 454 nm (LBX-445-100-CSB), 488 nm (LBX-488-200-CSB), et 561 nm (LMX-561L-200-COL) est utilisé pour exciter les fluorophores. Un collimateur à fibre corrigé (RGBV Fiber Collimators 60FC Sukhamburg) est utilisé pour produire un faisceau de sortie collimaté TEM00 de 2,2 mm de diamètre pour toutes les longueurs d'onde. La polarisation du faisceau est tournée d'un angle de 5 degrés avant de frapper un expandeur de faisceau X4 (GBE04-A) et produit un faisceau TEM00 de 8,8 mm. Le SLM est un modulateur rapide de phase binaire 0 ou π (QXGA), il est conjugué au plan image pour faire de l'illumination aléatoire par speckle TIRF. L'anneau utilisé sur ce montage a été conçu de la même manière que décrite au début du chapitre, il a ici un diamètre moyen de 6.05 mm et est positionné dans un plan conjugué au plan focal arrière de l'objectif. L'objectif utilisé dans cette expérience a un grandissement de 100X avec une ouverture numérique de 1.49 (Nikon CFI SR APO 100X). Un filtre passe-bande a été utilisé pour l'émission de la protéine de fluorescence verte (GFP) (Semrock FF01-514/30-25) et pour la RFP du mcherry (Semrock FF01-650/92). Deux caméras sCMOS ORCA FLASH4.0 v3 (100 fps, cable camera link, Hamamatsu) sont utilisées pour collecter la fluorescence à deux longueurs d'ondes différentes.

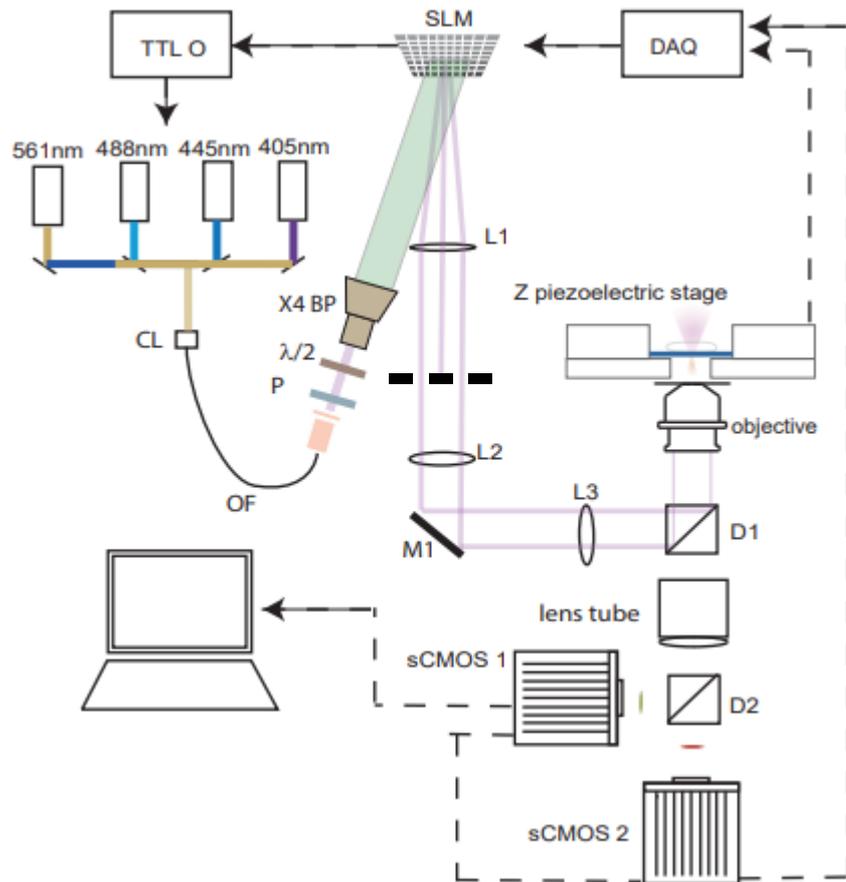


FIGURE 4.12 – Les images sont enregistrées de manière séquentielle grâce à un DAQ qui déclenche l’affichage du motif sur le SLM à partir d’un signal TTL provenant de la caméra sCMOS. Le SLM permet de générer un faisceau de Bessel avec des phases aléatoires. Le masque en forme d’anneau est placé dans le plan focal objet de la lentille L_1 et permet de laisser passer le faisceau de Bessel et de filtrer la lumière résiduelle qui ne serait pas en réflexion totale. Le signal de fluorescence est collecté par l’objectif de microscope (100X, NA 1.49) et un filtre dichroïque permet de faire l’imagerie en deux couleurs en séparant les deux longueurs d’ondes sur deux caméras.

Comme pour le montage avec diffuseur de l’Institut Fresnel, nous avons été confronté à la perte de la majeure partie de l’intensité du laser d’excitation à cause de la présence du filtre spatial. L’astuce que nous avons trouvée, a été de générer un faisceau de Bessel à l’aide du SLM. En générant un faisceau de Bessel, la lumière du laser est focalisée sur un anneau dans le plan focal de la lentille L_1 . En pratique le masque de phase affiché sur le SLM binaire, avec des phases aléatoires 0 ou π , qui permet de générer les éclaircissements aléatoires est multiplié par un masque d’anneaux concentriques

de période p , alternant 0 et π . La multiplication entre le masque de phase aléatoire et le masque d'anneaux concentriques est une multiplication booléenne. Quatre combinaisons sont possibles sur chaque pixel, la seule donnant l'état on (π) étant $on \times on$, 1/4 des pixels sont allumés sur le SLM. La période p des anneaux est déterminée en amont en utilisant la formule des réseaux :

$$\sin \theta = \frac{\lambda}{p} \quad (4.1)$$

Cela nous permet de trouver le rayon R de l'anneau désiré dans le plan de Fourier qui est directement lié à l'angle θ par la relation :

$$\tan \theta = \frac{R}{f_1} \quad (4.2)$$

où f_1 est la distance focale de la lentille L_1 . Le lien entre ces différentes grandeurs est résumé Figure 4.13. Le faisceau de Bessel ainsi généré n'est pas parfait et une fraction de la lumière n'est pas concentrée sur l'anneau dans le plan de Fourier, le masque reste donc indispensable pour obtenir une illumination évanescente.

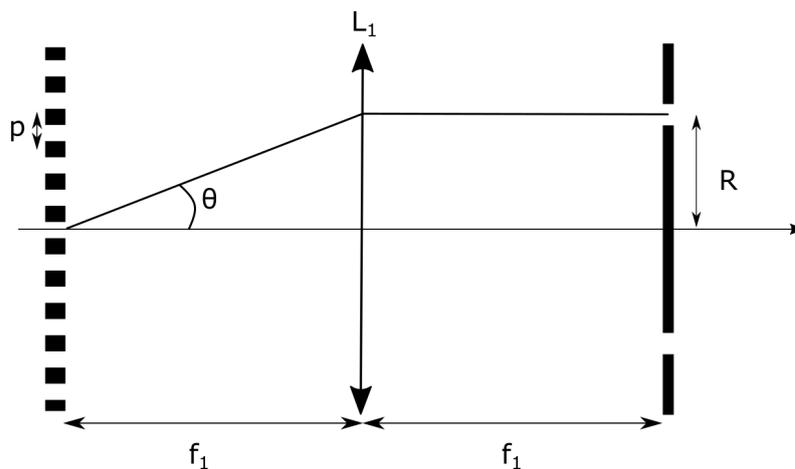
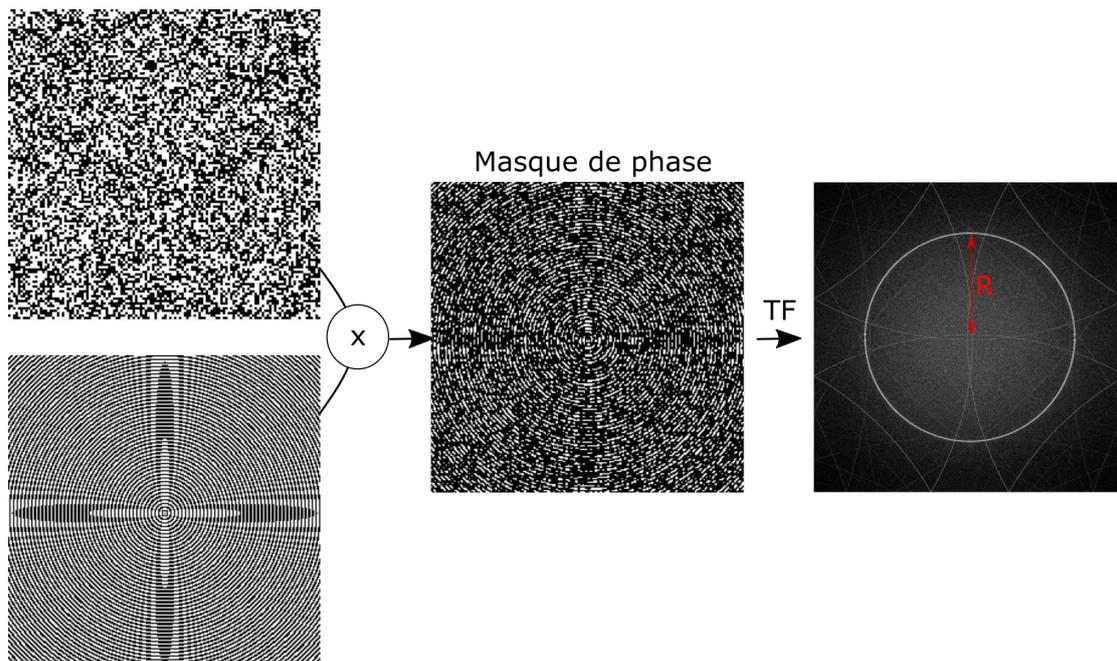


FIGURE 4.13 – Génération des speckles évanescents avec un SLM. Sur le SLM sont multipliés un masque de phases aléatoires avec un masque d’anneaux concentriques. Le période des anneaux est choisie en utilisant la formule des réseaux.

4.5.2 Comparaison RIM, TIRF-RIM et TIRF-SIM

Sur ce montage avec SLM pour la génération des illuminations de speckles, nous avons fait de nouvelles mesures sur la mire calibrée Argolight. Nous avons vu dans les chapitres précédents deux différences théoriques notables sur les reconstructions obtenues à partir d’éclaircissements de speckles propagatifs ou évanescents. Comme nous avons pu le vérifier expérimentalement au début du chapitre, le contenu fréquentiel

des speckles propagatifs et évanescents (et donc de leurs fonctions d'autocorrélations) est différent. Le spectre des speckles évanescents présente un fort rebond en amplitude autour de la fréquence de coupure, à l'inverse du cas des speckles propagatifs dont l'amplitude décroît continument. Nous avons donc conclu et confirmé par des simulations (chapitre 3) que la résolution latérale serait meilleure pour le TIRF-RIM. Pour le vérifier expérimentalement nous avons fait des acquisitions à budget de photons constant avec des éclairagements propagatifs et évanescents. Les reconstructions obtenues sont présentées Figure 4.14. On constate qu'avec 100 illuminations, l'homogénéité des reconstructions ne sont pas suffisantes pour voir une différence entre les deux. En revanche avec 400 illuminations la résolution semble effectivement être meilleure avec les éclairagements de speckles évanescents (TIRF-RIM).

La seconde différence entre les deux modalités d'imagerie que nous attendions suite aux simulations présentées au chapitre 3, était le nombre d'illumination nécessaire pour faire une reconstruction satisfaisante (en terme d'homogénéité). Pour cela, toujours sur la mire, nous avons fait quatre piles de 100 images avec des speckles évanescents et propagatifs. Nous avons formé quatre images de variances pour chacune des piles puis calculé leur écart-type pour voir les fluctuations sur la variance. Le résultat est présenté Figure 4.14 et montre que les fluctuations de la variance sont effectivement plus importantes avec des éclairagements de speckles propagatifs.

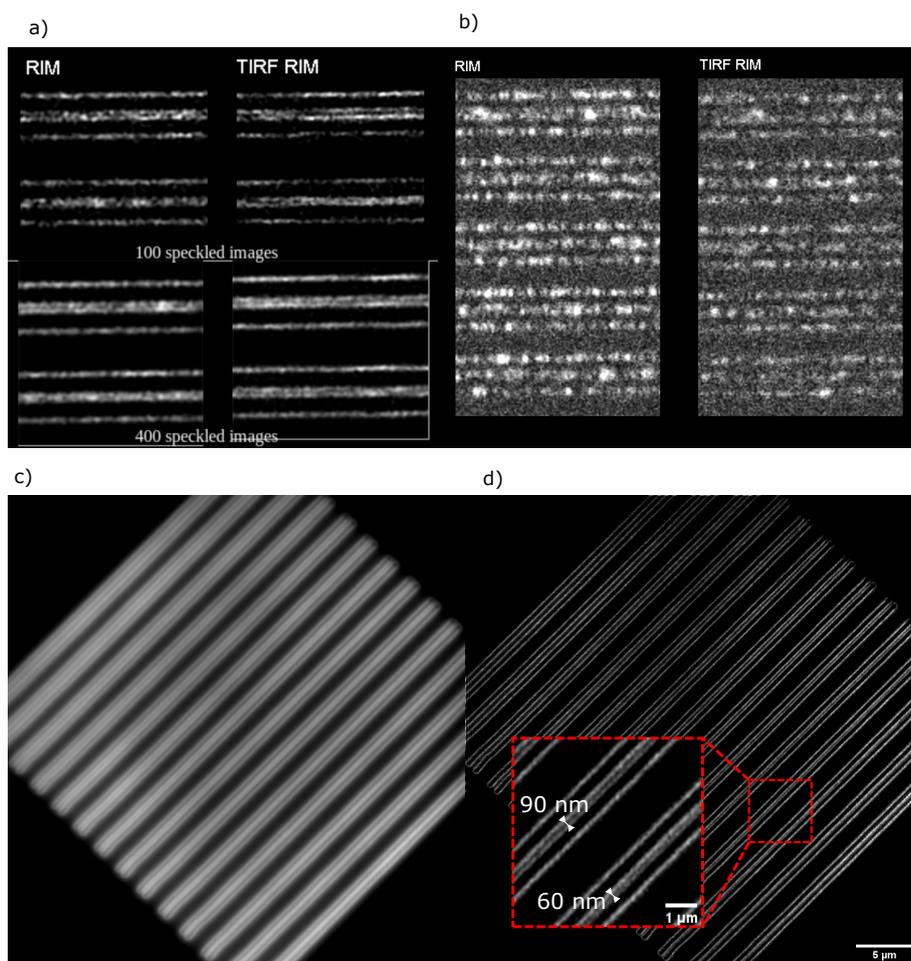


FIGURE 4.14 – a) Reconstructions RIM et TIRF-RIM avec 100 et 400 illuminations. Avec 400 illuminations on constate que la résolution du TIRF-RIM est légèrement meilleure que le RIM. b) Comparaison des fluctuations de RIM et TIRF-RIM. Quatre images de variances ont été formées à partir de 100 images de speckles. L'écart type de ces quatre image est ici représenté. Les fluctuations du RIM avec des speckles propagatifs sont plus importantes qu'avec des speckles pseudo-évanescents. c) et d) images champ large de la mire Argolight, plein champ et reconstruction TIRF-RIM respectivement. Avec la reconstruction TIRF-RIM les lignes séparées de 90 nm sont nettement distinguables et celles de 60 nm le sont presque.

La capacité de TIRF-RIM à obtenir une résolution inférieure à 100 nm est confirmée dans la Figure 4.15 où des macrophages fixes montés dans l'eau sont imagés en conditions réelles. La méthode FRC (*Fourier Ring Correlation*) [6] estime la résolution de la reconstruction TIRF-RIM à 86 nm. Notez que nous n'avons pas été en mesure d'imager correctement ce type d'échantillon avec notre TIRF-SIM. Même si les données SIM brutes étaient moins bruitées et plus contrastées que les données RIM, les

reconstructions fournies par fairSIM étaient entachées de trop d'artefacts, Figure 4.15.

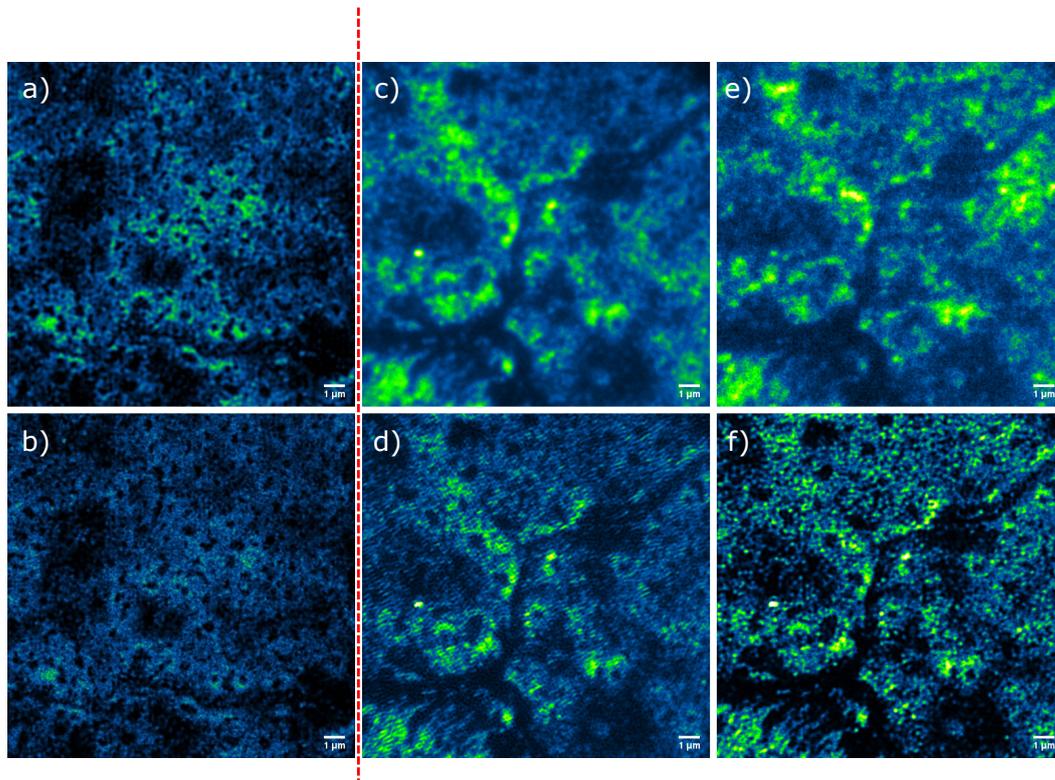


FIGURE 4.15 – a) et b) images plein champ et reconstruction TIRF-RIM respectivement. c) et e) images brutes TIRF-SIM et TIRF-RIM. Les acquisitions étant faite à budget de photons constant les images SIM (9 images) sont moins bruitées que les images RIM (400 images). d) reconstruction TIRF-SIM qui a échoué et f) reconstruction TIRF-RIM.

4.5.3 Dynamique des podosomes

Dans cette dernière section, nous démontrons le potentiel du TIRF-RIM pour l'imagerie cellulaire sur échantillons vivants en étudiant la dynamique des filaments de paxilline et de F-actine dans les podosomes formés à la surface des macrophages [67].

Nous avons enregistré des films en deux couleurs sur 3 minutes d'observation. Les images super-résolues de TIRF-RIM ont été formées à partir de 100 images de speckles, la résolution temporelle du film TIRF-RIM était alors de 0,12s. La Figure 4.16.A présente une image bicolore montrant les nanoclusters de paxilline entourant les noyaux de podosomes en F-actine [74]. La résolution spatiale de l'image de paxilline a été estimée à 96nm en utilisant la FRC, c'est-à-dire proche de celle obtenue avec l'échantillon fixe (86 nm), Figure 4.15. La ressemblance entre les images de l'échantillon fixe et de l'échantillon vivant, Figure 4.16.C indique que le flou induit par les déplacements des molécules et le bruit granulaire dû à l'inhomogénéité d'illumination

(qui est nécessairement plus important avec 100 illuminations de speckle qu'avec 400)
sont mineurs.

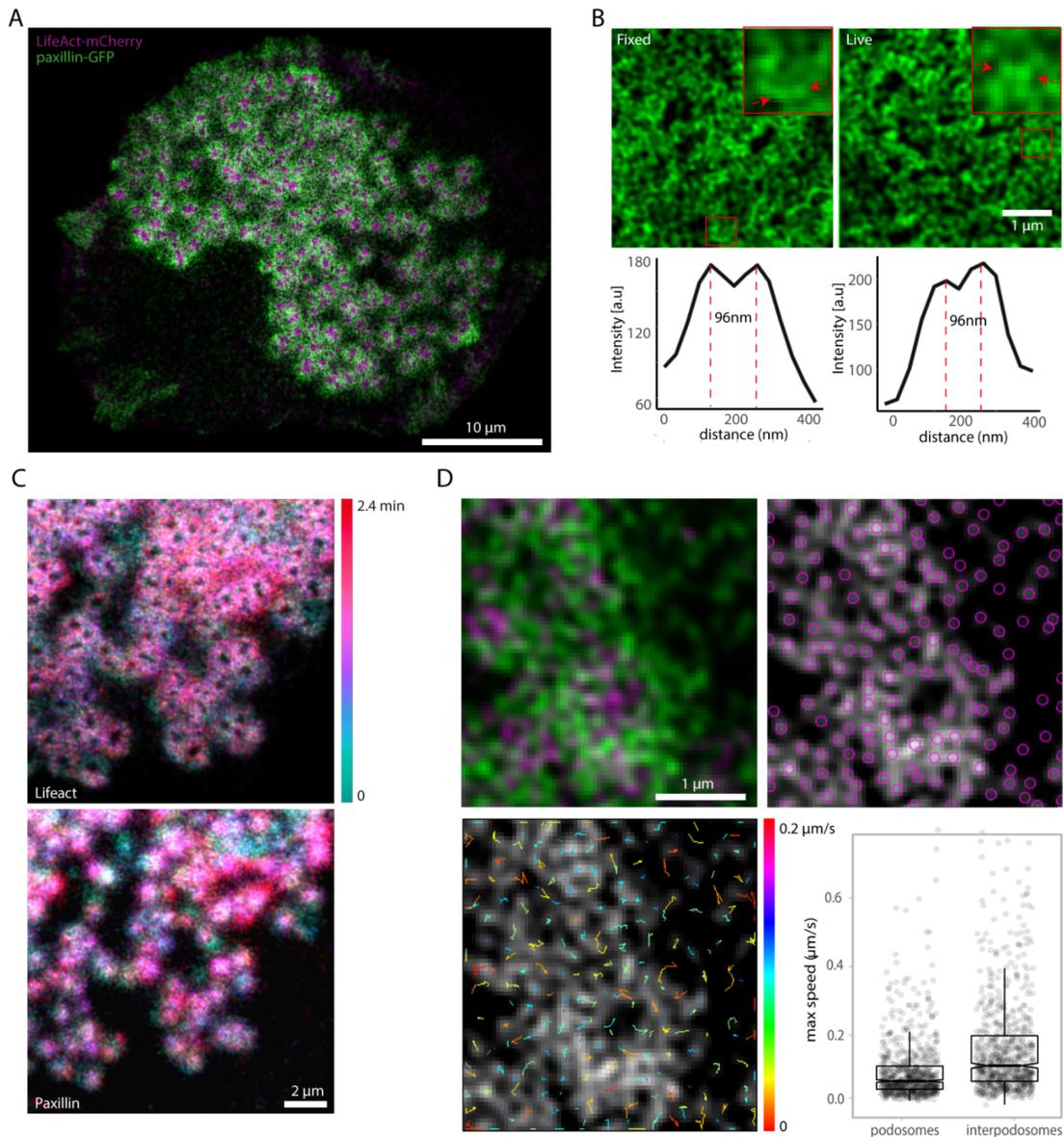


FIGURE 4.16 – Dynamique de la paxilline et de la F-actine sur des podosomes de macrophages. Les reconstructions TIRF-RIM sont faites à partir de 100 images de speckle. A) Image deux-couleurs du réseau de F-actine (magenta) et paxilline (vert). B) Comparaison entre l'image de paxilline d'un macrophage fixe (400 speckles) et d'un vivant (100 speckles). La résolution sur le macrophage fixe (gauche) est estimée à environ 86 nm et sur le vivant (droite) à 96 nm. C) Image couleur encodée temporellement de la dynamique d'un podosome suivi pendant 3 min. D) Étude des trajectoires de paxilline avec TrackMate. En haut à gauche, zoom sur un podosome. En haut à droite, nanoclusters de paxilline détectés. En bas à gauche, trajectoires des nanoclusters. En bas à droite, statistique de la vitesse maximum des nanoclusters. Ceux à proximité (moins de $1\mu m$) d'un centre de podosome sont plus lents que les autres (interpodosomes).

La Figure 4.16.B montre la dynamique du podosome (codée par couleur dans le temps) sur trois minutes. On peut voir que la plupart des podosomes restent présents pendant le temps d'observation de 3 minutes, ce qui confirme la faible toxicité du TIRF-RIM (la durée de vie moyenne des podosomes sur une surface de verre est d'environ 10 minutes [60]). Le faible taux de pixels blancs (correspondant à la superposition de toutes les couleurs) confirme que la résolution temporelle du film était suffisante pour suivre la dynamique élevée de l'échantillon. Afin d'évaluer de manière quantitative ces déplacements, nous avons suivi les nanoclusters pendant 3 min en utilisant Trackmat (logiciel Fiji), 4.16.D. Les trajectoires obtenues ont été utilisées pour estimer la vitesse maximale des clusters (4.16.E). Pour vérifier la précision de l'estimation de la vitesse avec une expérience de contrôle, nous avons appliqué la même procédure à des échantillons fixés au paraformaldéhyde et nous avons obtenu une vitesse maximale pour les nanoclusters de paxilline inférieure à $0.01\mu m/s$ (Figure 4.17). Le suivi des amas de paxilline dans des cellules vivantes a montré que leur vélocité maximale (en moyenne) était plus faible lorsqu'ils étaient proches du noyau d'un podosome (typiquement à moins d'un micron du centre de l'anneau du podosome) que lorsqu'ils en étaient plus éloignés (environ $0.6\mu m/s$ et $1\mu m/s$ respectivement), voir Figure 4.16.D-E, les deux étant au-dessus de la sensibilité du suivi.

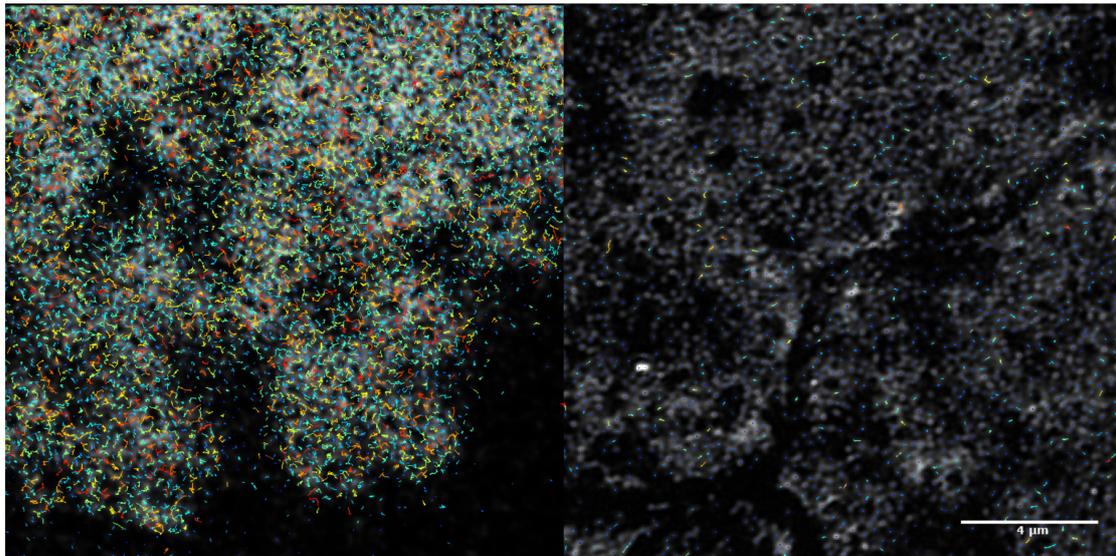


FIGURE 4.17 – Comparaison des trajectoires mesurées des nanoclusters de paxilline sur un macrophage vivant (gauche) et fixé (à droite). Cette expérience de contrôle confirme que les trajectoires observées des nanoclusters de paxilline ne sont pas des artefacts mais bien une mesure de la dynamique de l'échantillon. Cela permet également d'estimer la sensibilité de la méthode de suivie, elle est inférieure à $0.005\mu m/s$.

4.6 Préparation des échantillons

Les cellules COS-7 ont été fixées sur une *coverslip* dans du glutaraldéhyde à 0,3% et du Triton X-100 à 0,25% dans un tampon pour cytosquelette pendant 2 minutes. Elles ont ensuite été post-fixées dans du glutaraldéhyde à 2% dans un tampon pour cytosquelette pendant 10 minutes. Ensuite, les groupes aldéhyde/imine ont été réduits dans du borohydrure de sodium frais (1 mg/mL dans du PBS), durant 2 x 5min. Elles ont été lavées 3 x 10 min dans du PBS. Le marquage de l'actine a été effectué par 165 nM de phalloidine-alexa 488 dans du PBS (ThermoFisher A12379) pendant 1h à température ambiante. Les cellules ont ensuite été montées sur une lame propre avec du Fluoromount (Sigma F4680), pendant 1h à température ambiante.

Pour les expériences sur vivant à Toulouse, les macrophages ont été transfectées avec des lentivirus LifeAct marqués mCherry et GFP-paxilline (installation BiVic Toulouse) pendant trois jours comme décrit dans [71]. Les macrophages ont été placées sur un FluoroDish (WPI FD35-100), les cellules étant orientées vers le bas, et immergées dans du RPMI sans rouge de phénol, supplémenté avec 10% de FCS (Thermo Fisher 32404-014). Pendant les acquisitions, les échantillons de cellules ont été maintenus à 37°C dans une atmosphère humidifiée à 5% de CO₂.

4.7 Conclusion

Dans ce chapitre, nous avons vu en détails comment notre montage pour faire de la microscopie TIRF-RIM et RIM a été réalisé. Un diffuseur ou un SLM est positionné dans un plan conjugué au plan focal image. Un filtre en forme d'anneau que nous avons obtenu en ablatant un miroir par impulsions laser puis positionné dans le plan conjugué au plan de Fourier de l'objectif. Ce filtre permet de couper les rayons n'étant pas en réflexion totale à l'interface où est situé l'objet à étudier. Dans le cas où nous utilisons un SLM, celui-ci peut être utilisé pour générer un faisceau de Bessel qui permet de réduire les pertes d'intensité dues à la présence du masque. Nous avons pu confirmer sur la mire calibrée Argolight que la résolution des images TIRF-RIM était deux fois meilleure que les images de fluorescence conventionnelles et légèrement meilleure que les images RIM classique (speckle propagatif sans masque). Enfin nous avons pu étudier la dynamiques des podosomes de macrophages avec une résolution latérale inférieure à 90 nm.

Conclusion et perspectives

4.8 Conclusion

La microscopie de fluorescence est un outil puissant pour l'étude des mécanismes cellulaires. Du fait du décalage de Stokes, c'est une méthode en champ sombre donc très contrastée. Grâce à la spécificité du marquage fluorescent elle permet également de faire des études fonctionnelles et quantitatives des phénomènes observés. Cependant, pour aller plus loin et observer les mécanismes intra-cellulaires, la microscopie se heurte à la limite de diffraction. La résolution est limitée latéralement à environ 200 nm pour les meilleurs objectifs de microscopes et nous avons vu que le contraste des images de fluorescence était dégradé à cause de la fluorescence des plans hors-focus. Plusieurs stratégies ont été développées afin d'améliorer le sectionnement optique en microscopie de fluorescence telles que : la microscopie à deux photons, la microscopie confocale ou bien encore la microscopie à feuillet de lumière. Toutes ont leurs avantages et inconvénients, mais lorsqu'il s'agit d'observer des structures en proche contact avec la lamelle, la microscopie TIRF s'impose car elle permet un sectionnement optique inférieur à environ 200 nm grâce à l'illumination par une onde évanescente. C'est donc une méthode de choix pour l'étude des mécanismes se produisant au niveau des membranes cellulaires. Plusieurs techniques de microscopies super-résolues ont été adaptées à la configuration TIRF telles que celles par détection de molécules uniques (PALM, STORM, SOFI), le STED ou bien l'illumination structurée (TIRF-SIM). Cette dernière présente le meilleur compromis en termes de résolution spatiale, temporelle et phototoxicité et lui permet ainsi d'être employé sur un grand nombre d'échantillons biologique en conditions réelles. Cependant, son utilisation est limitée par la complexité de la configuration en réflexion totale. Les rares images super-résolues sur des échantillons vivants que l'on trouve dans la littérature en TIRF-SIM ont été obtenues avec un contrôle très rigoureux [17, 91] de l'illumination et souvent avec des objectifs à très grande ouverture numérique de 1.7 et avec des lamelles de saphir [66, 117, 53, 44] à l'exception de [17] avec une ouverture numérique de 1.45.

Dans ce contexte, le principal intérêt du TIRF-RIM est de produire des images super-résolues avec un objectif de microscope TIRF standard, et cela, sans compromettre la simplicité d'utilisation du TIRF. Le TIRF-RIM est une adaptation en configuration de réflexion totale interne du RIM [55, 71] que nous avons présentée dans le chapitre 2, qui consiste à utiliser des éclaircissements de speckle aléatoires puis de reconstruire une image super-résolue à partir de la variance des images enregistrées (entre 100 et

400 images). En plus du gain en résolution, le RIM permet d'obtenir une meilleure suppression de la fluorescence hors-focus, toujours présente sur des images TIRF. À l'inverse de la microscopie TIRF-SIM, le TIRF-RIM est beaucoup plus robuste, car ne nécessite pas de connaître les illuminations utilisées et parce que la statistique des speckles est insensible aux aberrations.

Plusieurs comparaisons ont été effectuées entre RIM et TIRF-RIM puis entre TIRF-SIM et TIRF-RIM, numériquement (chapitre 3) et expérimentalement (chapitre 4). Nous avons pu démontrer que par la nature du spectre fréquentiel de la fonction d'auto-corrélation des speckles, la résolution transverse de TIRF-RIM était sensiblement meilleure qu'en RIM. Nous l'avons vérifié non seulement sur des données synthétiques (l'étoile de Siemens au chapitre 3) mais aussi sur des données réelles avec l'Argo-SIM de Argolight au chapitre 4. Dans ce dernier, nous avons montré que TIRF-RIM pouvait permettre de distinguer les barreaux espacés de 90 nm et quasiment ceux espacés de 60 nm (avec un objectif TIRF standard d'ouverture numérique 1.49). Cette performance est comparable au sparse-SIM [117] récemment développé mais sans aucun *a priori* sur l'objet à reconstruire. Nous avons également constaté que le TIRF-RIM nécessitait moins d'images que le RIM classique et bénéficiait donc d'une meilleure résolution temporelle. Ceci est principalement dû au fait que les grains de speckle évanescents sont plus fins et plus rapprochés les uns des autres et recouvrant ainsi de manière plus homogène le plan de l'échantillon que les grains de speckle dispersés dans le cas propagatif. Enfin nous avons comparé TIRF-SIM avec TIRF-RIM, les simulations ont montré la robustesse de TIRF-RIM vis-à-vis du décalage de Stokes, mais surtout de la présence de fuites (excitation non-évanescents). Expérimentalement nous avons été dans l'incapacité de reconstruire correctement, sans artefacts, les données TIRF-SIM avec le programme *open source* fairSIM.

Enfin le gain en sectionnement optique de TIRF-RIM par rapport au TIRF classique a été démontré sur des cellules fixées en conditions réelles. Le TIRF-RIM a ensuite démontré son efficacité sur des macrophages vivants, en deux couleurs avec une résolution inférieure à 100 nm et une résolution temporelle de 1 seconde pour les observations sur de grandes échelles de temps et grands champs de vue. Sur des observations plus courtes, le TIRF-RIM a permis de suivre la trajectoire de *nanoclusters* de paxillin avec une résolution de 120 nm et une résolution temporelle de 120 ms.

À titre comparatif, la dynamique de sites d'adhésion de l'intégrine a précédemment été observée par d'autres techniques de microscopie super-résolue, mais jamais avec une telle résolution spatio-temporelle. PALM, SOFI, et TIRF-SIM ont permis l'observation de sites focaux d'adhésion avec une résolution de 100 nm, mais une résolution temporelle de 10 secondes [28, 52]. *Bayesian localization microscopy* a obtenu une résolution de 50 nm, mais une résolution temporelle de 4 secondes [22]. Tandis que le récent spt-PALM a imagé des sites focaux d'adhésion avec une impressionnante résolution spatio-temporelle de 50 nm et 20 ms [90, 83], mais n'a permis de suivre qu'une unique protéine et sans voir le *nanocluster*.

4.9 Perspectives

4.9.1 Speckles guidés

Une possibilité que nous avons déjà commencée à explorer serait d'utiliser des fibres optiques multimodes pour générer les speckles. Pour cela, on couple la lumière en sortie de fibre directement dans la lamelle par la tranche comme représenté Figure 4.18 et avec l'utilisation d'un objectif à eau. Nous pensons qu'il est ainsi possible de générer des speckles évanescents avec une très grande fréquence spatiale, ce qui permettrait d'améliorer encore plus la résolution latérale des images reconstruites ainsi que la résolution temporelle en utilisant encore moins d'illuminations. Cette configuration permettrait également de faire de l'imagerie en champ sombre, la lumière d'excitation n'étant pas collectée par l'objectif. Ainsi deux modes d'observations super-résolues seraient possibles, TIRF-RIM en collectant la lumière de fluorescence et cohérent, car seule la lumière diffractée par l'objet est collectée. En configuration de réflexion totale le champ diffracté par l'objet étant complètement négligeable devant le champ réfléchi, il est donc impossible d'obtenir des images contrastées. Cette configuration pourrait permettre de faire de la microscopie bimodale, en réflexion totale, super-résolue. En plus de l'information fonctionnelle apportée par la fluorescence, une information structurelle de l'échantillon observée serait apportée par l'image en champ sombre. Le tout dans un microscope fibré d'une grande simplicité d'utilisation pour l'utilisateur.

Le prototype que nous avons commencé à développer (voir Figure 4.18) utilise un coupleur de fibre 1x4 pour éclairer l'échantillon dans quatre directions et obtenir une illumination la plus homogène possible. Très récemment Thomas Mangeat a développé à Toulouse un système fibré vibrant pour créer et changer les illuminations de speckle sans diffuseur ni SLM, il serait donc simple de modifier les illuminations avec notre système. La principale difficulté restante est le couplage de la lumière dans la lamelle. Pour cela nous avons conçu un porte échantillon avec des tranchées sur chaque côté permettant de positionner les fibres (voir Figure 4.18).

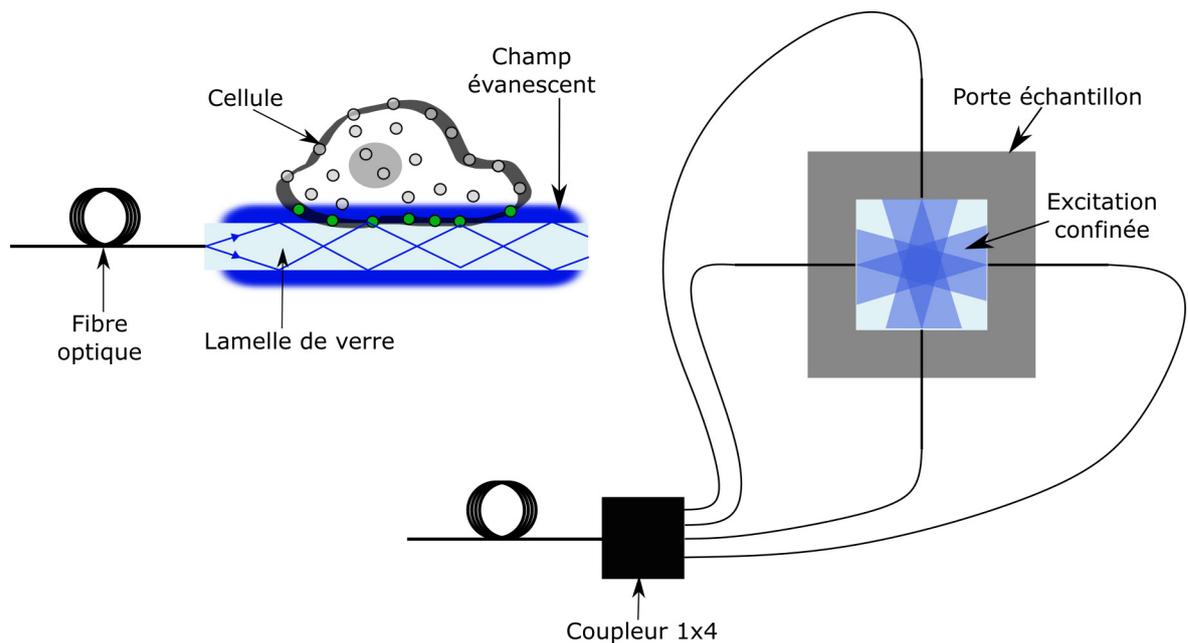


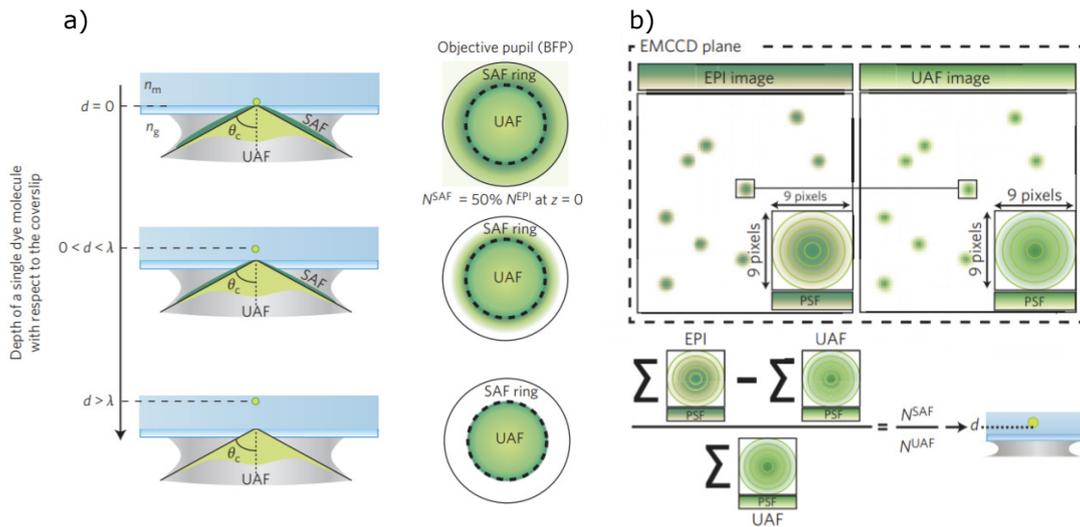
FIGURE 4.18 – Vue de coté (gauche) et de dessus (droite) du système utilisé pour créer les speckles évanescents guidés. Des fibres optiques de faibles ouvertures numériques sont approchées de la tranche de la lamelle de verre sur laquelle se trouve l'échantillon.

Jusqu'ici le porte échantillon a été fabriqué en impression 3D et manque de précision pour le positionnement des fibres et le couplage de la lumière dans la lamelle. En outre, les tests que nous avons menés ont été faits sur des lamelles trop grandes ce qui diminue la puissance d'excitation en son centre. Pour améliorer ce système nous pensons qu'il serait possible de réduire la distance entre l'extrémité des fibres et la centre de la lamelle en réduisant sa taille puis en faisant appel à un prestataire extérieur pour la fabrication du porte échantillon. Une amélioration supplémentaire serait d'avoir les parties du porte échantillon bloquant la lamelle métalliser pour ne pas perdre de puissance d'excitation.

4.9.2 TIRF-RIM axialement résolue

En microscopie par détection de molécules uniques, la résolution axiale est toujours bien moins bonne que la résolution latérale. Un fluorophore situé proche de la lamelle (à environ une longueur d'onde) rayonne un champ proche qui peut être converti en champ propagatif et peut alors être collecté par un objectif à grande ouverture numérique. Ce champ appelé *super-critical fluorescence signal* (SAF) décroît exponentiellement avec la distance d entre le fluorophore émetteur et la surface (voir Figure 4.19), tandis que le nombre de photons émis sous l'angle critique *under-critical fluorescence signal* (UAF) reste à peu près constant. En 2015 il a été proposé [14] d'exploiter cette propriété pour déterminer avec une précision de 20 nm la position axiale

de molécules uniques dans une expérience de STORM. La solution proposée par les auteurs est de mesurer sur une seule caméra séparée en deux parties (voir Figure 4.19), la totalité du signal de fluorescence (EPI = UAF+SAF) sur une moitié de la caméra et le signal UAF sur l'autre moitié. Pour ne collecter que le signal UAF, il suffit de placer dans le plan de Fourier de l'objectif à la détection, un filtre spatiale dont le diamètre correspond à l'angle de réflexion totale.



Bourg *et. al* Nature Photonics (2015) 587-583, 9(9)

FIGURE 4.19 – a) Signal SAF pour différentes positions d'une molécule fluorescente par rapport à une surface. Plus la molécule est proche plus le signal SAF est important. b) Détection simultanée du signal EPI=UAF+SAF et du signal UAF. En faisant la différence des deux le signal SAF peut être déterminé. Le rapport du nombre de photons SAF/UAF permet de déterminer la position axiale du fluorophore. Tirée de [14].

Nous pensons qu'il serait possible d'utiliser la même stratégie avec des éclaircissements de speckle à la différence qu'on ne détecterait pas de molécules uniques, mais un volume correspondant à l'excitation d'un grain de speckle. Ainsi en plus de la super-résolution du TIRF-RIM et de son sectionnement optique, il serait possible d'obtenir une information sur la topographie de la surface observée.

Bibliographie

- [1] David W ALLAN. « Statistics of Atomic Frequency Standards ». In : *PROCEEDINGS OF THE IEEE* 54 (2 1966).
- [2] E. J. AMBROSE. « A surface contact microscope for the study of cell movements [32] ». In : 178.4543 (1956), p. 1194. ISSN : 00280836. DOI : [10.1038/1781194a0](https://doi.org/10.1038/1781194a0).
- [3] D. AXELROD. « Cell-substrate contacts illuminated by total internal reflection fluorescence ». In : *Journal of Cell Biology* 89.1 (avr. 1981), p. 141-145. ISSN : 00219525. DOI : [10.1083/jcb.89.1.141](https://doi.org/10.1083/jcb.89.1.141). URL : <http://rupress.org/jcb/article-pdf/89/1/141/1074638/141.pdf>.
- [4] Daniel AXELROD, Nancy L. THOMPSON et Thomas P. BURGHARDT. « Total internal reflection fluorescent microscopy ». In : *Journal of Microscopy* 129 (1 jan. 1983), p. 19-28. ISSN : 1365-2818. DOI : [10.1111/J.1365-2818.1983.tb04158.X](https://doi.org/10.1111/J.1365-2818.1983.tb04158.X). URL : <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1365-2818.1983.tb04158.x%20https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1365-2818.1983.tb04158.x%20https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-2818.1983.tb04158.x>.
- [5] Jeremy J. AXELROD et Daniel AXELROD. « Light scattering in TIRF microscopy : A theoretical study of the limits to surface selectivity ». In : *Biophysical Journal* 120.15 (2021), p. 2952-2968. ISSN : 0006-3495. DOI : <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2021.06.025>. URL : <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0006349521005129>.
- [6] Niccolò BANTERLE et al. « Fourier ring correlation as a resolution criterion for super-resolution microscopy ». In : *Journal of Structural Biology* 183.3 (2013), p. 363-367. ISSN : 1047-8477. DOI : <https://doi.org/10.1016/j.jsb.2013.05.004>. URL : <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1047847713001184>.
- [7] Mark BATES, Timothy R. BLOSSER et Xiaowei ZHUANG. « Short-Range Spectroscopic Ruler Based on a Single-Molecule Optical Switch ». en. In : *Physical Review Letters* 94.10 (mars 2005). ISSN : 0031-9007, 1079-7114. DOI : [10.1103/PhysRevLett.94.108101](https://doi.org/10.1103/PhysRevLett.94.108101). URL : <https://link.aps.org/doi/10.1103/PhysRevLett.94.108101> (visité le 16/09/2018).

- [8] Mario BERTERO, Patrizia BOCCACCI et Christine De MOI. « Introduction to Inverse Problems in Imaging ». In : *Introduction to Inverse Problems in Imaging* (déc. 1998). DOI : [10.1201/9781003032755](https://doi.org/10.1201/9781003032755). URL : <https://www.taylorfrancis.com/books/mono/10.1201/9781003032755/introduction-inverse-problems-imaging-mario-bertero-patrizia-boccacci-christine-de-mol>.
- [9] Eric BETZIG et al. « Imaging Intracellular Fluorescent Proteins at Nanometer Resolution ». en. In : *Science* 313.5793 (sept. 2006), p. 1642-1645. ISSN : 0036-8075, 1095-9203. DOI : [10.1126/science.1127344](https://doi.org/10.1126/science.1127344). URL : <http://science.sciencemag.org/content/313/5793/1642> (visité le 17/09/2018).
- [10] J. BEUTHAN et al. « The spatial variation of the refractive index in biological cells ». In : *Physics in Medicine and Biology* 41 (3 mars 1996), p. 369. ISSN : 0031-9155. DOI : [10.1088/0031-9155/41/3/002](https://doi.org/10.1088/0031-9155/41/3/002). URL : <https://iopscience.iop.org/article/10.1088/0031-9155/41/3/002%20https://iopscience.iop.org/article/10.1088/0031-9155/41/3/002/meta>.
- [11] M L BLUE et al. « Coexpression of T4 and T8 on peripheral blood T cells demonstrated by two-color fluorescence flow cytometry. » In : *The Journal of Immunology* 134.4 (1985).
- [12] Pierre BON et al. « Label-free evanescent microscopy for membrane nanotomography in living cells ». In : *Journal of Biophotonics* 7.11-12 (nov. 2014), p. 857-862. ISSN : 18640648. DOI : [10.1002/jbio.201300095](https://doi.org/10.1002/jbio.201300095). URL : <http://dx.doi.org/10.1002/jbio.201300095>.
- [13] Max BORN et Emil WOLF. *Principles of optics electromagnetic theory of propagation, interference and diffraction of light*. Pergamon Press, 1959.
- [14] N. BOURG et al. « Direct optical nanoscopy with axially localized detection ». In : *Nature Photonics* 2015 9:99 (9 août 2015), p. 587-593. ISSN : 1749-4893. DOI : [10.1038/nphoton.2015.132](https://doi.org/10.1038/nphoton.2015.132). URL : <https://www.nature.com/articles/nphoton.2015.132>.
- [15] Maia BRUNSTEIN, Maxime TEREMETZ et §, ‡ AND HÉ, KARINE AND TOURAIN, CHRISTOPHE AND §JJ, ‡ AND OHEIM, MARTIN. « Eliminating Unwanted Far-Field Excitation in Objective-Type TIRE. Part I. Identifying Sources of Nonevanescent Excitation Light ». In : (). DOI : [10.1016/j.bpj.2013.12.049](https://doi.org/10.1016/j.bpj.2013.12.049). URL : <http://dx.doi.org/10.1016/j.bpj.2013.12.049>.
- [16] Maia BRUNSTEIN et al. « Eliminating Unwanted Far-Field Excitation in Objective-Type TIRE. Part I. Identifying Sources of Nonevanescent Excitation Light ». In : *Biophysical Journal* 106 (5 mars 2014), p. 1020-1032. ISSN : 0006-3495. DOI : [10.1016/J.BPJ.2013.12.049](https://doi.org/10.1016/J.BPJ.2013.12.049).
- [17] Maia BRUNSTEIN et al. « Full-field dual-color 100-nm super-resolution imaging reveals organization and dynamics of mitochondrial and ER networks ». In : *Opt. Express* 21.22 (nov. 2013), p. 26162-26173. DOI : [10.1364/OE.21.026162](https://doi.org/10.1364/OE.21.026162). URL : <https://opg.optica.org/oe/abstract.cfm?URI=oe-21-22-26162>.

- [18] Dmitriy M. CHUDAKOV, Sergey LUKYANOV et Konstantin A. LUKYANOV. « Fluorescent proteins as a toolkit for in vivo imaging ». In : *Trends in Biotechnology* 23.12 (déc. 2005), p. 605-613. ISSN : 0167-7799. DOI : [10.1016/J.TIBTECH.2005.10.005](https://doi.org/10.1016/J.TIBTECH.2005.10.005). URL : [http://www.cell.com/article/S0167779905002738/fulltext%20http://www.cell.com/article/S0167779905002738/abstract%20https://www.cell.com/trends/biotechnology/abstract/S0167-7799\(05\)00273-8](http://www.cell.com/article/S0167779905002738/fulltext%20http://www.cell.com/article/S0167779905002738/abstract%20https://www.cell.com/trends/biotechnology/abstract/S0167-7799(05)00273-8).
- [19] Euiheon CHUNG et al. « Two-Dimensional Standing Wave Total Internal Reflection Fluorescence Microscopy : Superresolution Imaging of Single Molecular and Biological Specimens ». In : *Biophysical Journal* 93 (5 sept. 2007), p. 1747-1757. ISSN : 0006-3495. DOI : [10.1529/BIOPHYSJ.106.097907](https://doi.org/10.1529/BIOPHYSJ.106.097907).
- [20] Jelmer CNOSSEN et al. « Localization microscopy at doubled precision with patterned illumination ». In : *Nature methods* 17.1 (2020), p. 59-63.
- [21] James W. COOLEY et John W. TUKEY. « An Algorithm for the Machine Calculation of Complex Fourier Series ». In : *Mathematics of Computation* 19 (90 avr. 1965), p. 297. ISSN : 00255718. DOI : [10.2307/2003354](https://doi.org/10.2307/2003354).
- [22] Susan COX et al. « Bayesian localization microscopy reveals nanoscale podosome dynamics ». In : *Nature Methods* 2011 9:29 (2 déc. 2011), p. 195-200. ISSN : 1548-7105. DOI : [10.1038/nmeth.1812](https://doi.org/10.1038/nmeth.1812). URL : <https://www.nature.com/articles/nmeth.1812>.
- [23] Liliana D'ALBA et Matthew D. SHAWKEY. « Melanosomes : Biogenesis, properties, and evolution of an ancient organelle ». In : *Physiological Reviews* 99 (1 jan. 2019), p. 1-19. ISSN : 15221210. DOI : [10.1152/PHYSREV.00059.2017/ASSET/IMAGES/LARGE/Z9J0041828870007.JPEG](https://doi.org/10.1152/PHYSREV.00059.2017/ASSET/IMAGES/LARGE/Z9J0041828870007.JPEG). URL : <https://journals.physiology.org/doi/abs/10.1152/physrev.00059.2017>.
- [24] Justin DEMMERLE et al. « Strategic and practical guidelines for successful structured illumination microscopy ». In : *Nature protocols* 12.5 (2017), p. 988-1010.
- [25] Graham T. DEMPSEY et al. « Evaluation of fluorophores for optimal performance in localization-based super-resolution imaging ». en. In : *Nature Methods* 8.12 (déc. 2011), p. 1027-1036. ISSN : 1548-7105. DOI : [10.1038/nmeth.1768](https://doi.org/10.1038/nmeth.1768). URL : <https://www.nature.com/articles/nmeth.1768> (visité le 16/09/2018).
- [26] Winfried DENK, James H. STRICKLER et Watt W. WEBB. « Two-Photon Laser Scanning Fluorescence Microscopy ». In : *Science* 248.4951 (1990), p. 73-76. ISSN : 00368075. DOI : [10.1126/SCIENCE.2321027](https://doi.org/10.1126/SCIENCE.2321027). URL : <https://www.science.org/doi/abs/10.1126/science.2321027>.
- [27] T. DERTINGER et al. « Fast, background-free, 3D super-resolution optical fluctuation imaging (SOFI) ». In : *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106 (52 déc. 2009), p. 22287-22292. ISSN : 00278424. DOI : [10.1073/PNAS.0907866106/SUPPL_FILE/0907866106SI.PDF](https://doi.org/10.1073/PNAS.0907866106/SUPPL_FILE/0907866106SI.PDF). URL : www.pnas.org/cgi/content/full/.

- [28] Hendrik DESCHOUT et al. « Complementarity of PALM and SOFI for super-resolution live-cell imaging of focal adhesions ». In : *Nature Communications* 2016 7:17 (1 déc. 2016), p. 1-11. ISSN : 2041-1723. DOI : [10.1038/ncomms13693](https://doi.org/10.1038/ncomms13693). URL : <https://www.nature.com/articles/ncomms13693>.
- [29] Howard DEVOE. « Optical Properties of Molecular Aggregates. I. Classical Model of Electronic Absorption and Refraction ». In : *The Journal of Chemical Physics* 41 (2 juill. 1964), p. 393. ISSN : 0021-9606. DOI : [10.1063/1.1725879](https://doi.org/10.1063/1.1725879). URL : <https://aip.scitation.org/doi/abs/10.1063/1.1725879>.
- [30] Andrea DLASKOVÁ et al. « Sample drift correction in 3D fluorescence photoactivation localization microscopy ». In : *Optics Express, Vol. 19, Issue 16, pp. 15009-15019* 19 (16 août 2011), p. 15009-15019. ISSN : 1094-4087. DOI : [10.1364/OE.19.015009](https://doi.org/10.1364/OE.19.015009). URL : <https://opg.optica.org/viewmedia.cfm?uri=oe-19-16-15009&seq=0&html=true%20https://opg.optica.org/abstract.cfm?uri=oe-19-16-15009%20https://opg.optica.org/oe/abstract.cfm?uri=oe-19-16-15009>.
- [31] Hans-Ulrich DODT et al. « Ultramicroscopy : three-dimensional visualization of neuronal networks in the whole mouse brain ». In : *NATURE METHODS* 4 (4 2006). DOI : [10.1038/NMETH1036](https://doi.org/10.1038/NMETH1036). URL : <http://www.nature.com/naturemethods>.
- [32] Carl ECKART et Gale YOUNG. « The approximation of one matrix by another of lower rank ». In : *Psychometrika* 1936 1 :3 1 (3 sept. 1936), p. 211-218. ISSN : 1860-0980. DOI : [10.1007/BF02288367](https://doi.org/10.1007/BF02288367). URL : <https://link.springer.com/article/10.1007/BF02288367>.
- [33] Reto FIOLKA. « Fluorescence microscopy; (120.3180) Interferometry; (100.2960) Image analysis; (100.3010) Image reconstruction techniques; (000.1430) Biology and medicine ». In : (2016). DOI : [10.1364/OE.24.029556](https://doi.org/10.1364/OE.24.029556). URL : <http://dx.doi.org/10.1364/OE.24.029556>.
- [34] Reto FIOLKA. « Seeing more with structured illumination microscopy ». In : *Methods in Cell Biology* 123 (jan. 2014), p. 295-313. ISSN : 0091-679X. DOI : [10.1016/B978-0-12-420138-5.00016-1](https://doi.org/10.1016/B978-0-12-420138-5.00016-1).
- [35] Reto FIOLKA, Markus BECK et Andreas STEMMER. « Structured illumination in total internal reflection fluorescence microscopy using a spatial light modulator ». In : *Opt. Lett.* 33.14 (juill. 2008), p. 1629-1631. DOI : [10.1364/OL.33.001629](https://doi.org/10.1364/OL.33.001629). URL : <http://opg.optica.org/ol/abstract.cfm?URI=ol-33-14-1629>.
- [36] Jan T. FROHN, Helmut F. KNAPP et Andreas STEMMER. « True optical resolution beyond the Rayleigh limit achieved by standing wave illumination ». In : *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97.13 (2000), p. 7232-7236. DOI : [10.1073/pnas.130181797](https://doi.org/10.1073/pnas.130181797). eprint : <https://www.pnas.org/doi/pdf/10.1073/pnas.130181797>. URL : <https://www.pnas.org/doi/abs/10.1073/pnas.130181797>.

- [37] D. GABOR. « A new microscopic principle. » In : *Nature* 161.4098 (mai 1948), p. 777-777. ISSN : 0028-0836. DOI : [10.1038/161777A0](https://doi.org/10.1038/161777A0). URL : <https://europepmc.org/article/med/18860291>.
- [38] Joseph W. GOODMAN. « Introduction to Fourier Optics ». In : (). URL : <https://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/summary?doi=10.1.1.382.5557>.
- [39] Joseph W. GOODMAN. « Speckle phenomena in optics : theory and applications ». In : (2007), p. 387.
- [40] E. GOOS et H. HÄNCHEN. « Ein neuer und fundamentaler Versuch zur Totalreflexion ». In : *Annalen der Physik* 436 (7-8 jan. 1947), p. 333-346. ISSN : 1521-3889. DOI : [10.1002/ANDP.19474360704](https://doi.org/10.1002/ANDP.19474360704). URL : <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/andp.19474360704> <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/andp.19474360704> <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/andp.19474360704>.
- [41] Travis J. GOULD, Jordan R. MYERS et Joerg BEWERSDORF. « Total internal reflection STED microscopy ». In : *Opt. Express* 19.14 (juill. 2011), p. 13351-13357. DOI : [10.1364/OE.19.013351](https://doi.org/10.1364/OE.19.013351). URL : <http://opg.optica.org/oe/abstract.cfm?URI=oe-19-14-13351>.
- [42] Herbert GROSS. *Handbook of optical Systems : Survey of Optical Instruments*. T. 4. 2008, p. 865-939. ISBN : 978-3-527-40380-6. URL : <https://www.wiley.com/en-us/Handbook+of+Optical+Systems%2C+Volume+4%3A+Survey+of+Optical+Instruments-p-9783527699247>.
- [43] Banat GUL et al. « Cell refractive index : Models, insights, applications and future perspectives ». In : *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy* 33 (2021), p. 102096. DOI : [10.1016/j.pdpdt.2020.102096](https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2020.102096). URL : <https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2020.102096>.
- [44] Min GUO et al. « Single-shot super-resolution total internal reflection fluorescence microscopy ». In : *Nature Methods* 2018 15 :6 15 (6 mai 2018), p. 425-428. ISSN : 1548-7105. DOI : [10.1038/s41592-018-0004-4](https://doi.org/10.1038/s41592-018-0004-4). URL : <https://www.nature.com/articles/s41592-018-0004-4>.
- [45] Nadya G. GURSKAYA et al. « Engineering of a monomeric green-to-red photoactivatable fluorescent protein induced by blue light ». en. In : *Nature Biotechnology* 24.4 (avr. 2006), p. 461-465. ISSN : 1546-1696. DOI : [10.1038/nbt1191](https://doi.org/10.1038/nbt1191). URL : <https://www.nature.com/articles/nbt1191> (visité le 20/03/2018).
- [46] GUSTAFSSON, AGARD et SEDAT. « I5M : 3D widefield light microscopy with better than 100 nm axial resolution ». en. In : *Journal of Microscopy* 195.1 (juill. 1999), p. 10-16. ISSN : 1365-2818. DOI : [10.1046/j.1365-2818.1999.00576.x](https://doi.org/10.1046/j.1365-2818.1999.00576.x). URL : <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1046/j.1365-2818.1999.00576.x> (visité le 16/09/2018).

- [47] M. G. L. GUSTAFSSON. « Surpassing the lateral resolution limit by a factor of two using structured illumination microscopy ». en. In : *Journal of Microscopy* 198.2 (mai 2000), p. 82-87. ISSN : 1365-2818. DOI : [10.1046/j.1365-2818.2000.00710.x](https://doi.org/10.1046/j.1365-2818.2000.00710.x). URL : <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1046/j.1365-2818.2000.00710.x> (visité le 16/09/2018).
- [48] Mats G.L. GUSTAFSSON et al. « Three-Dimensional Resolution Doubling in Wide-Field Fluorescence Microscopy by Structured Illumination ». In : *Biophysical Journal* 94 (12 juin 2008), p. 4957-4970. ISSN : 0006-3495. DOI : [10.1529/BIOPHYSJ.107.120345](https://doi.org/10.1529/BIOPHYSJ.107.120345).
- [49] Stefan W. HELL et Jan WICHMANN. « Breaking the diffraction resolution limit by stimulated emission : stimulated-emission-depletion fluorescence microscopy ». EN. In : *Optics Letters* 19.11 (juin 1994), p. 780-782. ISSN : 1539-4794. DOI : [10.1364/OL.19.000780](https://doi.org/10.1364/OL.19.000780). URL : <https://www.osapublishing.org/ol/abstract.cfm?uri=ol-19-11-780> (visité le 08/09/2018).
- [50] Fritjof HELMCHEN et Winfried DENK. « Deep tissue two-photon microscopy ». In : *Nature Methods* 2005 2:122 (12 nov. 2005), p. 932-940. ISSN : 1548-7105. DOI : [10.1038/nmeth818](https://doi.org/10.1038/nmeth818). URL : <https://www.nature.com/articles/nmeth818>.
- [51] Nicholas G. HORTON et al. « In vivo three-photon microscopy of subcortical structures within an intact mouse brain ». In : *Nature Photonics* 2013 7:37 (3 jan. 2013), p. 205-209. ISSN : 1749-4893. DOI : [10.1038/nphoton.2012.336](https://doi.org/10.1038/nphoton.2012.336). URL : <https://www.nature.com/articles/nphoton.2012.336>.
- [52] Shiqiong HU et al. « Structured illumination microscopy reveals focal adhesions are composed of linear subunits ». In : *Cytoskeleton* 72 (5 mai 2015), p. 235-245. ISSN : 1949-3592. DOI : [10.1002/CM.21223](https://doi.org/10.1002/CM.21223). URL : <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/cm.21223>
<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/cm.21223>
<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/cm.21223>.
- [53] Xiaoshuai HUANG. « Fast, long-term, super-resolution imaging with Hessian structured illumination microscopy ». en. In : *nature biotechnology* (2018), p. 13.
- [54] Jan HUISKEN et al. « Optical sectioning deep inside live embryos by selective plane illumination microscopy ». In : *Science* 305.5686 (août 2004), p. 1007-1009. ISSN : 00368075. DOI : [10.1126/SCIENCE.1100035/SUPPL_FILE/HUISKEN.SOM.PDF](https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1100035/SUPPL_FILE/HUISKEN.SOM.PDF). URL : <https://www.science.org/doi/abs/10.1126/science.1100035>.
- [55] Jerome IDIER et al. « On the Superresolution Capacity of Imagers Using Unknown Speckle Illuminations ». In : *IEEE Transactions on Computational Imaging* 4 (1 nov. 2017), p. 87-98. DOI : [10.1109/TCI.2017.2771729](https://doi.org/10.1109/TCI.2017.2771729).

- [56] A. JOST et al. « Structured illumination fluorescence microscopy with distorted excitations using a filtered blind-SIM algorithm ». In : *Optics Letters*, Vol. 38, Issue 22, pp. 4723-4726 38 (22 nov. 2013), p. 4723-4726. ISSN : 1539-4794. DOI : 10.1364/OL.38.004723. URL : <https://opg.optica.org/viewmedia.cfm?uri=ol-38-22-4723&seq=0&html=true%20https://opg.optica.org/abstract.cfm?uri=ol-38-22-4723%20https://opg.optica.org/ol/abstract.cfm?uri=ol-38-22-4723>.
- [57] Björn KEMPER et al. « Integral refractive index determination of living suspension cells by multifocus digital holographic phase contrast microscopy ». In : <https://doi.org/10.1117/1.2798639> 12 (5 sept. 2007), p. 054009. ISSN : 1083-3668. DOI : 10.1117/1.2798639. URL : <https://www.spiedigitallibrary.org/journals/journal-of-biomedical-optics/volume-12/issue-5/054009/Integral-refractive-index-determination-of-living-suspension-cells-by-multifocus/10.1117/1.2798639.full%20https://www.spiedigitallibrary.org/journals/journal-of-biomedical-optics/volume-12/issue-5/054009/Integral-refractive-index-determination-of-living-suspension-cells-by-multifocus/10.1117/1.2798639.short>.
- [58] Daekeun KIM, Euiheon CHUNG et Peter T. SO. « Extended resolution wide-field optical imaging : objective-launched standing-wave total internal reflection fluorescence microscopy ». In : *Optics Letters*, Vol. 31, Issue 7, pp. 945-947 31 (7 avr. 2006), p. 945-947. ISSN : 1539-4794. DOI : 10.1364/OL.31.000945. URL : <https://opg.optica.org/viewmedia.cfm?uri=ol-31-7-945&seq=0&html=true%20https://opg.optica.org/abstract.cfm?uri=ol-31-7-945%20https://opg.optica.org/ol/abstract.cfm?uri=ol-31-7-945>.
- [59] Shigeharu KIMURA et Chusuke MUNAKATA. « Dependence of 3-D optical transfer functions on the pinhole radius in a fluorescent confocal optical microscope ». In : *Applied optics* 29 (20 juill. 1990), p. 3007. ISSN : 1559-128X. DOI : 10.1364/AO.29.003007. URL : <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20567368/>.
- [60] Anna LABERNADIE et al. « Protrusion force microscopy reveals oscillatory force generation and mechanosensing activity of human macrophage podosomes ». In : *Nature Communications* 2014 5 :1 5 (1 nov. 2014), p. 1-10. ISSN : 2041-1723. DOI : 10.1038/ncomms6343. URL : <https://www.nature.com/articles/ncomms6343>.
- [61] Simon LABOUESSE. « Imagerie à éclaircissements structurées inconnus ». Theses. Aix Marseille Université, 2017.
- [62] Simon LABOUESSE et al. « Joint Reconstruction Strategy for Structured Illumination Microscopy with Unknown Illuminations ». In : *IEEE Transactions on Image Processing* 26 (5 mai 2017), p. 2480-2493. ISSN : 10577149. DOI : 10.1109/TIP.2017.2675200.

- [63] Romain F. LAINE et al. « From single-molecule spectroscopy to super-resolution imaging of the neuron : a review ». en. In : *Methods and Applications in Fluorescence* 4.2 (2016), p. 022004. ISSN : 2050-6120. DOI : [10.1088/2050-6120/4/2/022004](https://doi.org/10.1088/2050-6120/4/2/022004). URL : <http://stacks.iop.org/2050-6120/4/i=2/a=022004> (visité le 20/03/2018).
- [64] Amit LAL, Chunyan SHAN et Peng XI. « Structured illumination microscopy image reconstruction algorithm ». In : *IEEE Journal of Selected Topics in Quantum Electronics* 22 (4 juill. 2016), p. 50-63. ISSN : 15584542. DOI : [10.1109/JSTQE.2016.2521542](https://doi.org/10.1109/JSTQE.2016.2521542).
- [65] Louis LANDWEBER. « An iteration formula for Fredholm integral equations of the first kind ». In : *American Journal of Mathematics* 73 (1951), p. 615-624.
- [66] Dong LI et al. « Extended-resolution structured illumination imaging of endocytic and cytoskeletal dynamics ». In : *Science* 349 (6251 août 2015). ISSN : 10959203. DOI : [10.1126/SCIENCE.AAB3500/SUPPL_FILE/LI-SM.PDF](https://doi.org/10.1126/SCIENCE.AAB3500/SUPPL_FILE/LI-SM.PDF).
- [67] Stefan LINDER et Petra KOPP. « Podosomes at a glance ». In : *Journal of Cell Science* 118.10 (mai 2005), p. 2079-2082. ISSN : 0021-9533. DOI : [10.1242/jcs.02390](https://doi.org/10.1242/jcs.02390). eprint : <https://journals.biologists.com/jcs/article-pdf/118/10/2079/1527126/2079.pdf>. URL : <https://doi.org/10.1242/jcs.02390>.
- [68] L. B. LUCY, LUCY et L. B. « An iterative technique for the rectification of observed distributions ». In : *Astronomical Journal* 79 (6 juin 1974), p. 745. ISSN : 0004-6256. DOI : [10.1086/111605](https://doi.org/10.1086/111605). URL : <https://ui.adsabs.harvard.edu/abs/1974AJ.....79..745L/abstract>.
- [69] Guillaume MAIRE et al. « Experimental demonstration of quantitative imaging beyond Abbe's limit with optical diffraction tomography ». In : *Physical Review Letters* 102.21 (mai 2009), p. 213905. ISSN : 00319007. DOI : [10.1103/PHYSREVLETT.102.213905](https://doi.org/10.1103/PHYSREVLETT.102.213905). URL : <https://journals.aps.org/prl/abstract/10.1103/PhysRevLett.102.213905>.
- [70] Henk Jan Van MANEN et al. « Refractive Index Sensing of Green Fluorescent Proteins in Living Cells Using Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy ». In : *Biophysical Journal* 94 (8 avr. 2008), p. L67-L69. ISSN : 0006-3495. DOI : [10.1529/BIOPHYSJ.107.127837](https://doi.org/10.1529/BIOPHYSJ.107.127837).
- [71] Thomas MANGEAT et al. « Super-resolved live-cell imaging using random illumination microscopy ». In : *Cell Reports Methods* 1 (1 mai 2021), p. 100009. ISSN : 2667-2375. DOI : [10.1016/J.CRMETH.2021.100009](https://doi.org/10.1016/J.CRMETH.2021.100009).
- [72] Richard J. MARSH et al. « Artifact-free high-density localization microscopy analysis ». In : *Nature Methods* 2018 15 :9 15 (9 juill. 2018), p. 689-692. ISSN : 1548-7105. DOI : [10.1038/s41592-018-0072-5](https://doi.org/10.1038/s41592-018-0072-5). URL : <https://www.nature.com/articles/s41592-018-0072-5>.

- [73] Alexa L. MATTHEYSES et Daniel AXELROD. « Direct measurement of the evanescent field profile produced by objective-based total internal reflection fluorescence ». In : *Journal of Biomedical Optics* 11.1 (2006), p. 1-7. DOI : [10.1117/1.2161018](https://doi.org/10.1117/1.2161018). URL : <https://doi.org/10.1117/1.2161018>.
- [74] Marjolein B.M. MEDDENS et al. « Actomyosin-dependent dynamic spatial patterns of cytoskeletal components drive mesoscale podosome organization ». In : *Nature Communications* 2016 7:17 (1 oct. 2016), p. 1-17. ISSN : 2041-1723. DOI : [10.1038/ncomms13127](https://doi.org/10.1038/ncomms13127). URL : <https://www.nature.com/articles/ncomms13127>.
- [75] Jerome MERTZ. « Optical sectioning microscopy with planar or structured illumination ». In : *Nature Methods* 2011 8:108 (10 sept. 2011), p. 811-819. ISSN : 1548-7105. DOI : [10.1038/nmeth.1709](https://doi.org/10.1038/nmeth.1709). URL : <https://www.nature.com/articles/nmeth.1709>.
- [76] Lars MEYER et al. « Dual-Color STED Microscopy at 30-nm Focal-Plane Resolution ». In : *Small* 4.8 (août 2008), p. 1095-1100. ISSN : 1613-6829. DOI : [10.1002/smll.200800055](https://doi.org/10.1002/smll.200800055). URL : <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/smll.200800055> (visité le 17/09/2018).
- [77] M. MINSKY. « Microscopy Apparatus ». In : *U.S. Patent 3,013,467, Dec. 19, 1961 (filed Nov. 7, 1957)*. (1957).
- [78] E. MUDRY et al. « Structured illumination microscopy using unknown speckle patterns ». In : *Nature Photonics* 2012 6:56 (5 avr. 2012), p. 312-315. ISSN : 1749-4893. DOI : [10.1038/nphoton.2012.83](https://doi.org/10.1038/nphoton.2012.83). URL : <https://www.nature.com/articles/nphoton.2012.83>.
- [79] M. A. A. NEIL, R. JUŠKAITIS et T. WILSON. « Method of obtaining optical sectioning by using structured light in a conventional microscope ». In : *Opt. Lett.* 22.24 (déc. 1997), p. 1905-1907. DOI : [10.1364/OL.22.001905](https://doi.org/10.1364/OL.22.001905). URL : <http://opg.optica.org/ol/abstract.cfm?URI=ol-22-24-1905>.
- [80] Lukas NOVOTNY, Lukas NOVOTNY et Bert HECHT. « Principles of nano-optics ». In : (2006). URL : <https://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/summary?doi=10.1.1.132.4832>.
- [81] Martin OHEIM et al. « Calibrating Evanescent-Wave Penetration Depths for Biological TIRF Microscopy ». In : *Biophysical Journal* 117.5 (2019), p. 795-809. ISSN : 0006-3495. DOI : <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2019.07.048>. URL : <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0006349519306642>.
- [82] « Open-source image reconstruction of super-resolution structured illumination microscopy data in ImageJ ». In : *Nature Communications* 2016 7:17 (1 mars 2016), p. 1-6. ISSN : 2041-1723. DOI : [10.1038/ncomms10980](https://doi.org/10.1038/ncomms10980). URL : <https://www.nature.com/articles/ncomms10980>.

- [83] Thomas ORRÉ et al. « Molecular motion and tridimensional nanoscale localization of kindlin control integrin activation in focal adhesions ». In : *Nature Communications* 2021 12 :1 12 (1 mai 2021), p. 1-17. ISSN : 2041-1723. DOI : [10.1038/s41467-021-23372-w](https://doi.org/10.1038/s41467-021-23372-w). URL : <https://www.nature.com/articles/s41467-021-23372-w>.
- [84] Martin OVESNY et al. « ThunderSTORM : a comprehensive ImageJ plug-in for PALM and STORM data analysis and super-resolution imaging ». en. In : *Bioinformatics* 30.16 (août 2014), p. 2389-2390. ISSN : 1367-4803. DOI : [10.1093/bioinformatics/btu202](https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu202). URL : <https://academic.oup.com/bioinformatics/article/30/16/2389/2748167> (visité le 17/09/2018).
- [85] Dylan M. OWEN, Markus SAUER et Katharina GAUS. « Fluorescence localization microscopy ». In : *Communicative and Integrative Biology* 5.4 (juill. 2012), p. 345-349. ISSN : null. DOI : [10.4161/cib.20348](https://doi.org/10.4161/cib.20348). URL : <https://doi.org/10.4161/cib.20348> (visité le 20/03/2018).
- [86] James B. PAWLEY. « Handbook of biological confocal microscopy : Third edition ». In : *Handbook of Biological Confocal Microscopy : Third Edition* (2006), p. 1-985. DOI : [10.1007/978-0-387-45524-2](https://doi.org/10.1007/978-0-387-45524-2).
- [87] Benjamin RAPPAZ et al. « Measurement of the integral refractive index and dynamic cell morphometry of living cells with digital holographic microscopy ». In : *Optics Express, Vol. 13, Issue 23, pp. 9361-9373* 13 (23 nov. 2005), p. 9361-9373. ISSN : 1094-4087. DOI : [10.1364/OPEX.13.009361](https://doi.org/10.1364/OPEX.13.009361). URL : <https://opg.optica.org/viewmedia.cfm?uri=oe-13-23-9361&seq=0&html=true%20https://opg.optica.org/abstract.cfm?uri=oe-13-23-9361%20https://opg.optica.org/oe/abstract.cfm?uri=oe-13-23-9361>.
- [88] Emmanuel G. REYNAUD et al. « Light sheet-based fluorescence microscopy : More dimensions, more photons, and less photodamage ». In : <http://dx.doi.org/10.2976/1.2974980> 2 (5 oct. 2010), p. 266-275. ISSN : 19552068. DOI : [10.2976/1.2974980](https://doi.org/10.2976/1.2974980). URL : <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.2976/1.2974980>.
- [89] William Hadley RICHARDSON. « Bayesian-Based Iterative Method of Image Restoration* ». In : *J. Opt. Soc. Am.* 62.1 (jan. 1972), p. 55-59. DOI : [10.1364/JOSA.62.000055](https://doi.org/10.1364/JOSA.62.000055). URL : <http://opg.optica.org/abstract.cfm?URI=josa-62-1-55>.
- [90] Olivier ROSSIER et al. « Integrins β_1 and β_3 exhibit distinct dynamic nanoscale organizations inside focal adhesions ». In : *Nature Cell Biology* 2012 14 :10 14 (10 sept. 2012), p. 1057-1067. ISSN : 1476-4679. DOI : [10.1038/ncb2588](https://doi.org/10.1038/ncb2588). URL : <https://www.nature.com/articles/ncb2588>.
- [91] Julian ROTH et al. « Fast TIRF-SIM imaging of dynamic, low-fluorescent biological samples ». In : *Biomedical Optics Express, Vol. 11, Issue 7, pp. 4008-4026* 11 (7 juill. 2020), p. 4008-4026. ISSN : 2156-7085. DOI : [10.1364/BOE.391561](https://doi.org/10.1364/BOE.391561). URL : <https://opg.optica.org/viewmedia.cfm?uri=boe-11-7-4008&>

- seq=0&html=true%20https://opg.optica.org/abstract.cfm?uri=boe-11-7-4008%20https://opg.optica.org/boe/abstract.cfm?uri=boe-11-7-4008.
- [92] Michael J. RUST, Mark BATES et Xiaowei ZHUANG. « Sub-diffraction-limit imaging by stochastic optical reconstruction microscopy (STORM) ». en. In : *Nature Methods* 3.10 (oct. 2006), p. 793-796. ISSN : 1548-7105. DOI : [10.1038/nmeth929](https://doi.org/10.1038/nmeth929). URL : <https://www.nature.com/articles/nmeth929> (visité le 17/09/2018).
- [93] Lothar SCHERMELLEH et al. « Super-resolution microscopy demystified ». In : *Nature cell biology* 21.1 (2019), p. 72-84.
- [94] Bidisha SENGUPTA et al. « DNA Templates for Fluorescent Silver Clusters and I-Motif Folding ». In : *The Journal of Physical Chemistry C* 113.45 (nov. 2009), p. 19518-19524. ISSN : 1932-7447. DOI : [10.1021/jp906522u](https://doi.org/10.1021/jp906522u). URL : <https://doi.org/10.1021/jp906522u> (visité le 16/09/2018).
- [95] A. SENTENAC et al. « Tomographic diffractive microscopy with a wavefront sensor ». In : *Optics Letters*, Vol. 37, Issue 10, pp. 1631-1633 37.10 (mai 2012), p. 1631-1633. ISSN : 1539-4794. DOI : [10.1364/OL.37.001631](https://doi.org/10.1364/OL.37.001631). URL : <https://www.osapublishing.org/viewmedia.cfm?uri=ol-37-10-1631&seq=0&html=true%20https://www.osapublishing.org/abstract.cfm?uri=ol-37-10-1631%20https://www.osapublishing.org/ol/abstract.cfm?uri=ol-37-10-1631>.
- [96] D. E. SILVA et J. Y. WANG. « Wave-front interpretation with Zernike polynomials ». In : *Applied Optics*, Vol. 19, Issue 9, pp. 1510-1518 19 (9 mai 1980), p. 1510-1518. ISSN : 2155-3165. DOI : [10.1364/AO.19.001510](https://doi.org/10.1364/AO.19.001510). URL : <https://opg.optica.org/viewmedia.cfm?uri=ao-19-9-1510&seq=0&html=true%20https://opg.optica.org/abstract.cfm?uri=ao-19-9-1510%20https://opg.optica.org/ao/abstract.cfm?uri=ao-19-9-1510>.
- [97] Andreas STEMMER, Markus BECK et Reto FIOJKA. « Structured illumination in total internal reflection fluorescence microscopy using a spatial light modulator ». In : *Optics Letters*, Vol. 33, Issue 14, pp. 1629-1631 33 (14 juill. 2008), p. 1629-1631. ISSN : 1539-4794. DOI : [10.1364/OL.33.001629](https://doi.org/10.1364/OL.33.001629). URL : <https://opg.optica.org/viewmedia.cfm?uri=ol-33-14-1629&seq=0&html=true%20https://opg.optica.org/abstract.cfm?uri=ol-33-14-1629%20https://opg.optica.org/ol/abstract.cfm?uri=ol-33-14-1629>.
- [98] Gabriel STOKES. « On the change of refrangibility of light ». In : *Philosophical Transactions of the Royal Society of London* 142 (déc. 1852), p. 463-562. ISSN : 0261-0523. DOI : [10.1098/RSTL.1852.0022](https://doi.org/10.1098/RSTL.1852.0022). URL : <https://royalsocietypublishing.org/doi/abs/10.1098/rstl.1852.0022>.

- [99] Andrea L. STOUT et Daniel AXELROD. « Evanescent field excitation of fluorescence by epi-illumination microscopy ». In : *Applied Optics*, Vol. 28, Issue 24, pp. 5237-5242 28 (24 déc. 1989), p. 5237-5242. ISSN : 2155-3165. DOI : [10.1364/AO.28.005237](https://doi.org/10.1364/AO.28.005237). URL : <https://opg.optica.org/viewmedia.cfm?uri=ao-28-24-5237&seq=0&html=true%20https://opg.optica.org/abstract.cfm?uri=ao-28-24-5237%20https://opg.optica.org/ao/abstract.cfm?uri=ao-28-24-5237>.
- [100] N. STREIBL. « Three-dimensional imaging by a microscope ». In : *JOSA A*, Vol. 2, Issue 2, pp. 121-127 2.2 (fév. 1985), p. 121-127. ISSN : 1520-8532. DOI : [10.1364/JOSAA.2.000121](https://doi.org/10.1364/JOSAA.2.000121). URL : <https://www.osapublishing.org/viewmedia.cfm?uri=josaa-2-2-121&seq=0&html=true%20https://www.osapublishing.org/abstract.cfm?uri=josaa-2-2-121%20https://www.osapublishing.org/josaa/abstract.cfm?uri=josaa-2-2-121>.
- [101] Karel SVOBODA et Ryohei YASUDA. « Principles of Two-Photon Excitation Microscopy and Its Applications to Neuroscience ». In : *Neuron* 50 (6 juin 2006), p. 823-839. ISSN : 0896-6273. DOI : [10.1016/J.NEURON.2006.05.019](https://doi.org/10.1016/J.NEURON.2006.05.019).
- [102] Russell E. THOMPSON, Daniel R. LARSON et Watt W. WEBB. « Precise Nanometer Localization Analysis for Individual Fluorescent Probes ». In : *Biophysical Journal* 82.5 (mai 2002), p. 2775-2783. ISSN : 0006-3495. DOI : [10.1016/S0006-3495\(02\)75618-X](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(02)75618-X). URL : <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S000634950275618X> (visité le 15/09/2018).
- [103] A. N. TIKHONOV. « Solution of incorrectly formulated problems and the regularization method ». In : *Soviet Math. Dokl.* 4 (1963), p. 1035-1038.
- [104] Cathie VENTALON et Jerome MERTZ. « Quasi-confocal fluorescence sectioning with dynamic speckle illumination ». In : *Optics Letters*, Vol. 30, Issue 24, pp. 3350-3352 30 (24 déc. 2005), p. 3350-3352. ISSN : 1539-4794. DOI : [10.1364/OL.30.003350](https://doi.org/10.1364/OL.30.003350). URL : <https://opg.optica.org/viewmedia.cfm?uri=ol-30-24-3350&seq=0&html=true%20https://opg.optica.org/abstract.cfm?uri=ol-30-24-3350%20https://opg.optica.org/ol/abstract.cfm?uri=ol-30-24-3350>.
- [105] A. H. VOIE, D. H. BURNS et F. A. SPELMAN. « Orthogonal-plane fluorescence optical sectioning : Three-dimensional imaging of macroscopic biological specimens ». In : *Journal of Microscopy* 170.3 (juin 1993), p. 229-236. ISSN : 1365-2818. DOI : [10.1111/J.1365-2818.1993.tb03346.x](https://doi.org/10.1111/J.1365-2818.1993.tb03346.x). URL : <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1365-2818.1993.tb03346.x%20https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1365-2818.1993.tb03346.x%20https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-2818.1993.tb03346.x>.
- [106] Benoit WATTELLIER et al. « Quadriwave lateral shearing interferometry for quantitative phase microscopy of living cells ». In : *Optics Express*, Vol. 17, Issue 15, pp. 13080-13094 17.15 (juill. 2009), p. 13080-13094. ISSN : 1094-4087. DOI : [10.1364/OE.17.013080](https://doi.org/10.1364/OE.17.013080). URL : <https://www.osapublishing.org/>

- [viewmedia.cfm?uri=oe-17-15-13080&seq=0&html=true](https://www.osapublishing.org/abstract.cfm?uri=oe-17-15-13080&seq=0&html=true)<https://www.osapublishing.org/abstract.cfm?uri=oe-17-15-13080><https://www.osapublishing.org/oe/abstract.cfm?uri=oe-17-15-13080>.
- [107] Kai WICKER et al. « Phase optimisation for structured illumination microscopy ». In : *Optics Express*, Vol. 21, Issue 2, pp. 2032-2049 21 (2 jan. 2013), p. 2032-2049. ISSN : 1094-4087. DOI : [10.1364/OE.21.002032](https://doi.org/10.1364/OE.21.002032). URL : <https://opg.optica.org/viewmedia.cfm?uri=oe-21-2-2032&seq=0&html=true><https://opg.optica.org/abstract.cfm?uri=oe-21-2-2032><https://opg.optica.org/oe/abstract.cfm?uri=oe-21-2-2032>.
- [108] Norbert WIENER. « Extrapolation, Interpolation, and Smoothing of Stationary Time Series : With Engineering Applications ». In : *Extrapolation, Interpolation, and Smoothing of Stationary Time Series* (août 1949). DOI : [10.7551/MITPRESS/2946.001.0001](https://doi.org/10.7551/MITPRESS/2946.001.0001). URL : <https://direct.mit.edu/books/book/4361/Extrapolation-Interpolation-and-Smoothing-of>.
- [109] Jeremy D. WILSON, William J. COTTRELL et Thomas H. FOSTER. « Index-of-refraction-dependent subcellular light scattering observed with organelle-specific dyes ». In : <https://doi.org/10.1117/1.2437765> 12 (1 jan. 2007), p. 014010. ISSN : 1083-3668. DOI : [10.1117/1.2437765](https://doi.org/10.1117/1.2437765). URL : <https://www.spiedigitallibrary.org/journals/journal-of-biomedical-optics/volume-12/issue-1/014010/Index-of-refraction-dependent-subcellular-light-scattering-observed-with-organelle/10.1117/1.2437765.full><https://www.spiedigitallibrary.org/journals/journal-of-biomedical-optics/volume-12/issue-1/014010/Index-of-refraction-dependent-subcellular-light-scattering-observed-with-organelle/10.1117/1.2437765.short>.
- [110] T. WILSON et Colin J. R. SHEPPARD. « Theory and practice of scanning optical microscopy ». In : *Journal of The Optical Society of America A-optics Image Science and Vision* 4 (1984), p. 551-560.
- [111] Chris XU et Watt W. WEBB. « Multiphoton Excitation of Molecular Fluorophores and Nonlinear Laser Microscopy ». In : *Topics in Fluorescence Spectroscopy* (2002), p. 471-540. DOI : [10.1007/0-306-47070-5_11](https://doi.org/10.1007/0-306-47070-5_11). URL : https://link.springer.com/chapter/10.1007/0-306-47070-5_11.
- [112] « XVI. Functions of positive and negative type, and their connection the theory of integral equations ». In : *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series A, Containing Papers of a Mathematical or Physical Character* 209 (441-458 jan. 1909), p. 415-446. ISSN : 0264-3952. DOI : [10.1098/RSTA.1909.0016](https://doi.org/10.1098/RSTA.1909.0016). URL : <https://royalsocietypublishing.org/doi/abs/10.1098/rsta.1909.0016>.
- [113] Ichirou YAMAGUCHI. « Phase-Shifting Digital Holography ». In : *Digital Holography and Three-Dimensional Display* (août 2006), p. 145-171. DOI : [10.1007/0-387-31397-4_5](https://doi.org/10.1007/0-387-31397-4_5). URL : https://link.springer.com/chapter/10.1007/0-387-31397-4_5.

- [114] Andrew G. YORK et al. « Instant super-resolution imaging in live cells and embryos via analog image processing ». In : *Nature Methods* 2013 10 :11 10 (11 oct. 2013), p. 1122-1126. ISSN : 1548-7105. DOI : [10.1038/nmeth.2687](https://doi.org/10.1038/nmeth.2687). URL : <https://www.nature.com/articles/nmeth.2687>.
- [115] Rafael YUSTE. « Fluorescence microscopy today ». In : *Nature Methods* 2005 2 :12 2.12 (déc. 2005), p. 902-904. ISSN : 1548-7105. DOI : [10.1038/nmeth1205-902](https://doi.org/10.1038/nmeth1205-902). URL : <https://www.nature.com/articles/nmeth1205-902>.
- [116] F. ZERNIKE. « Phase contrast, a new method for the microscopic observation of transparent objects ». In : *Physica* 9.7 (juill. 1942), p. 686-698. ISSN : 0031-8914. DOI : [10.1016/S0031-8914\(42\)80035-X](https://doi.org/10.1016/S0031-8914(42)80035-X).
- [117] Weisong ZHAO et al. « Sparse deconvolution improves the resolution of live-cell super-resolution fluorescence microscopy ». In : *Nature Biotechnology* 2021 (nov. 2021), p. 1-12. ISSN : 1546-1696. DOI : [10.1038/s41587-021-01092-2](https://doi.org/10.1038/s41587-021-01092-2). URL : <https://www.nature.com/articles/s41587-021-01092-2>.