

# 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.