

Microscopie optique de surface à haute résolution sur des substrats-réseaux

E. Le Moal, J. Girard, G. Maire, P. C. Chaumet,
S. Monneret, H. Giovannini, K. Belkebir, A. Sentenac, A. Talneau

*Institut Fresnel (CNRS UMR 6133), Universités d'Aix-Marseille I & III,
Domaine Universitaire de Saint Jérôme,
Avenue Escadrille Normandie-Niemen, 13397 Marseille Cedex 20*

La microscopie optique en champ lointain est l'outil d'imagerie le plus répandu dans le domaine de la biologie en raison de ses propriétés non-invasives et de la possibilité d'observer sélectivement les éléments d'intérêt biologique grâce au marquage fluorescent. Cependant, la résolution spatiale de cette technique d'imagerie est limitée par la diffraction à quelques centaines de nanomètres pour la lumière visible. Améliorer la résolution spatiale des microscopes optiques a été un enjeu majeur de ces vingt dernières années. Dans le cas particulier de l'imagerie de surface, la limite de résolution définie par la diffraction peut être dépassée en détectant la partie non-propagative du champ émis par l'objet, laquelle possède de hautes fréquences spatiales. Notamment, cela peut être réalisé en balayant la surface de l'échantillon au moyen d'une pointe de taille nanométrique (microscopie optique en champ-proche). Une autre approche consiste à déposer l'échantillon sur un substrat diélectrique ou métallique nanostructuré capable de convertir les ondes évanescentes de haute fréquence spatiale en ondes propagatives ou, de manière équivalente, de réaliser un champ d'illumination comportant de hautes fréquences spatiales. Le principal avantage de ces approches est qu'elles ne nécessitent pas de balayer l'échantillon avec une pointe et qu'elles permettent un mode d'imagerie plein-champ.

Nous étendons ces concepts récents en imagerie assistée par réseau pour proposer une technique d'imagerie de surface d'échantillons fluorescents avec une résolution spatiale bien meilleure que celle imposée par la diffraction de la lumière. Notre approche est basée sur un microscope de fluorescence en réflexion totale interne (TIRFM), lequel est couramment utilisé en biologie, en particulier pour l'observation des membranes cellulaires et l'étude des dynamiques biomoléculaires. Dans cette technique, l'échantillon est illuminé en ondes évanescentes et seuls les marqueurs fluorescents proches de la surface du support de l'échantillon sont excités. Afin d'améliorer la résolution transverse du TIRFM tout en conservant une détection en champ lointain, il a été proposé d'illuminer l'échantillon avec une figure d'ondes stationnaires formée par les interférences de deux ou quatre ondes (SW-TIRFM). Il a été démontré que ce mode d'illumination améliore la résolution transverse d'un facteur deux par rapport à celle du TIRFM standard, i.e. une résolution de 100 nm pour une longueur d'onde d'illumination de 500 nm. Cependant, cette résolution reste toujours inférieure à $\lambda/2n$ où n est l'indice de réfraction du substrat. Pour dépasser cette limite, nous proposons de développer un microscope TIRF assisté par un réseau, dans lequel l'échantillon est illuminé par une grille de lumière de période petite devant la longueur d'onde, générée grâce à la structuration périodique du substrat.

Le cœur du projet réside dans l'utilisation d'un substrat-réseau capable de convertir une onde plane de fréquence spatiale relativement basse en une onde évanescente de haute fréquence

spatiale. Nous avons déjà conçu plusieurs substrats-réseaux qui vérifient cette condition. Ce sont des lames diélectriques d'indice de réfraction élevé portant des modes guidés de haute fréquence spatiale dans les domaines spectraux visible et proche-infrarouge. Leurs caractéristiques communes sont d'être des réseaux bidimensionnels avec un motif périodique triangulaire et une surface supérieure plane. Pour certains angles d'incidence, une onde plane peut être diffusée de manière résonante dans le mode de la lame. Dans ce cas, le champ à la surface de la lame est dominé par le champ de ce mode guidé.

L'échantillon est déposé sur le substrat-réseau qui est illuminé en réflexion totale interne à travers l'objectif du microscope. La fluorescence est collectée à l'aide du même objectif à immersion. Un premier type d'illumination consiste à éclairer le réseau par deux ondes planes contra-propagatives dont les angles d'incidences sont choisis pour exciter de manière résonante les modes de surface du substrat-réseau. Le champ résultant à la surface du substrat est dominé par l'interférence entre deux ondes guidées contra-propagatives qui forme une grille de lumière. Cette grille peut être déplacée en translation en changeant la phase relative des deux ondes planes incidentes. Une autre solution consiste à illuminer le réseau avec une seule onde plane dont l'angle est choisi pour exciter faiblement le mode de surface. Dans ce cas, la grille de lumière est générée par l'interférence entre l'onde transmise spéculaire et le mode guidée, et sa période est celle du réseau. La grille de lumière est alors déplacée en modifiant l'angle azimutal de l'onde plane incidente. Les images enregistrées aux différentes positions de la grille sont ensuite traitées par un algorithme d'inversion pour extraire la cartographie de la densité de fluorophores. Nous avons déjà développé un algorithme d'inversion basé sur une méthode de gradient conjugué et simulé le microscope TIRF assisté par réseau. Une part importante du travail numérique et théorique réside dans l'amélioration de l'algorithme d'inversion pour prendre en compte les imperfections du réseau et du schéma d'illumination.

La première étape dans l'application de cette technique d'imagerie consiste à caractériser expérimentalement sa résolution spatiale en réalisant une image de la grille de lumière qui est générée à la surface du substrat-réseau pour un schéma d'illumination donné. Cette étape est cruciale car les algorithmes d'inversion utilisent la distribution du champ d'excitation comme donnée *a priori* pour reconstruire la densité de fluorophores à partir des images enregistrées avec le microscope. Simuler le champ d'excitation à partir des paramètres idéaux des substrats-réseaux peut être source d'erreurs en raison des imperfections de leur fabrication. En outre, la mesure de l'intensité du champ à la surface du substrat-réseau est utile pour optimiser le schéma d'illumination. Deux approches sont en cours d'évaluation pour réaliser l'image de cette grille de lumière dont la période est inférieure à la limite de diffraction. D'une part, le dispositif optique est placé sous un microscope optique en champ proche pour une mesure directe de l'intensité du champ. D'autre part, nous utilisons des nanobilles fluorescentes déposées sur la surface du substrat-réseau en très faible densité. La possibilité de détecter ces nanobilles individuellement doit permettre de déterminer leur position avec une précision nanométrique. L'analyse des images de fluorescence obtenues pour différents angles azimutaux et différentes phases relatives des ondes planes incidentes servira à reconstruire une image de la grille de lumière à la surface du substrat-réseau.

A. Sentenac, P. C. Chaumet, et K. Belkebir, Phys. Rev. Lett. 97, 243901 (2006).

P. C. Chaumet, K. Belkebir et A. Sentenac, Phys. Rev. A 76, 013814 (2007).

A. Sentenac, K. Belkebir, H. Giovannini, et P. C. Chaumet, Opt. Lett. 33, 255 (2008).