

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



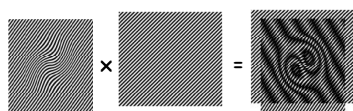
Eric Le Moal¹, Jules Girard^{1,2}, Guillaume Maire¹, Patrick C. Chaumet¹, Serge Monneret¹, Hugues Giovannini¹, Kamal Belkebir¹, Anne Sentenac¹, Anne Talneau²

¹ Institut Fresnel (CNRS UMR 6133), Universités d'Aix-Marseille I & III, Domaine Universitaire de Saint Jérôme, 13397 Marseille Cedex 20
² Laboratoire de Photonique et Nanostructures (CNRS UPR 20), Site Alcatel de Marcoussis, Route de Nozay, 91460 Marcoussis

1. Principe de l'illumination structurée

Illuminer l'échantillon avec un champ contenant de hautes fréquences spatiales permet d'étendre virtuellement la résolution spatiale du microscope.

Analogie avec les franges de moiré



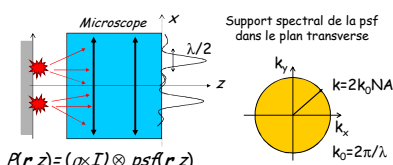
M. G. L. Gustafsson (2005) PNAS 102, 37, 13081-13086

L'échantillon est illuminé avec une figure périodique connue : une grille de lumière. La figure de battement (franges de moiré) qui apparaît correspond aux différences de fréquence spatiale entre la grille de lumière et la structure de l'échantillon. Elle contient des informations sur la structure fine de l'échantillon qui peuvent ne pas être accessibles sous illumination homogène.

Application à la microscopie de fluorescence en réflexion totale interne (TIRFM)

La résolution spatiale est limitée par la diffraction de la lumière.

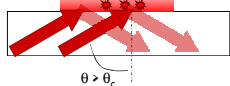
$P(r, z)$: intensité détectée
 ρ : densité de fluorophores
 I : intensité du champ d'illumination
 $psf(r, z)$: réponse du microscope



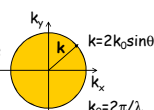
$$P(r, z) = (\rho \times I) \otimes psf(r, z)$$

TIRFM standard

$$I(r, 0) = I_0$$



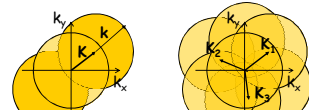
Le domaine de fréquences spatiales accessibles est borné par la psf .



$$P(k) \propto \rho(k) \times psf(k)$$

TIRFM en ondes stationnaires (SW-TIRFM)

$$I(r, 0) = I_0 [1 + \cos(K \cdot r + \Phi)] \quad K = 2k_0 \sin \theta$$



$$P(k) \propto \rho(k) \times [psf(k) + \alpha psf(k+K) + \beta psf(k-K)]$$

Résultat : résolution transverse améliorée d'un facteur 2 par rapport au TIRFM standard.

Limite : résolution transverse toujours inférieure à $\lambda/2n$ (n = indice de réfraction du substrat).

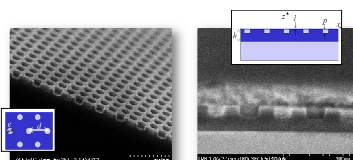
Solution : développer un microscope TIRF assisté par un réseau, dans lequel l'échantillon est illuminé par une grille de lumière de période petite devant la longueur d'onde, générée grâce à la structuration périodique du substrat.

A. Sentenac (2008) Opt. Lett. 33, 255

2. Structuration périodique du substrat

Réseaux résonants = guide d'onde + structure périodique

Guide d'onde : couche d'indice de réfraction élevé* portant des modes guidés de haute fréquence spatiale** dans le visible et l'infrarouge.
 * (a-Si:H, $n_0 = 4.3 + 0.1i$ à 630 nm)
 ** ($k_{mode} \approx 3.5k_0$ à 630 nm)



Réseaux 2D de motif périodique triangulaire et de période $d \cdot \lambda/3$.

$d = 157$ nm, $e = 50$ nm, $h = 88$ nm, $l = 19$ nm, $p = 50$ nm

3. Microscopie assistée par réseau résonant

Le réseau résonant permet de créer un champ possédant de hautes fréquences spatiales sur toute la surface du substrat.

Simulation de l'intensité du champ au-dessus du réseau

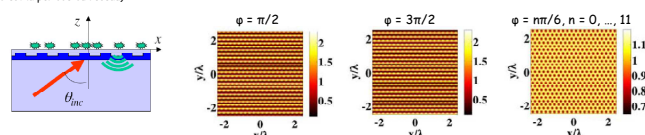
Illumination par une onde plane polarisée s

L'intensité à $z = 0$ est modélisée par une série de Rayleigh où $K_{n,m}$ sont les modes propres du réseau. Excitation résonante d'un des modes $K_{n,m}$ si $|k_{inc}^{\parallel} + K_{n,m}| = k_{mode}$

$$I'(r) = \left| \sum_{n,m \in \mathbb{Z}^2} A_{n,m} e^{iK_{n,m} \cdot r} \right|^2$$

A $\theta_{inc} = 65^\circ$ et $\varphi = \pi/2$ (angle azimutal), le champ au-dessus du réseau est dominé par les modes $K_{0,0}$ et $K_{-1,0}$ ($K_{-1,0} = 4\pi/d\sqrt{3}$) qui forment une figure d'interférence de période $d\sqrt{3}/2 \sim 135$ nm.

* (d est la période du réseau)

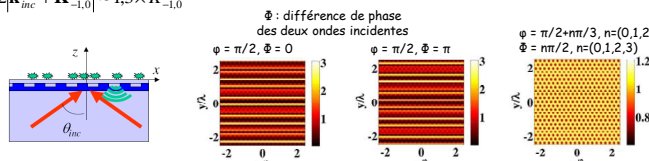


Illumination par deux ondes planes polarisées s

L'intensité au-dessus du réseau n'est plus périodique. Composantes de fréquence spatiale la plus élevée :

$$I'(r) \approx \left[A_{0,0} \cos(k_{inc} \cdot r + \frac{\varphi}{2}) + A_{-1,0} \cos(k_{inc} + K_{-1,0} \cdot r + \frac{\varphi}{2}) \right]^2$$

$$2|k_{inc}^{\parallel} + K_{-1,0}| \approx 1,3 \times K_{-1,0}$$



A. Sentenac (2009) J Opt. Soc. Am. A, sous presse.

- Fréquences spatiales du champ d'illumination définies par la périodicité du réseau
- Structures de hautes fréquences spatiales très contrastées
- Rotation et translation du champ structuré par rapport au réseau, grâce à φ et à $\bar{\varphi}$
- Intensité moyenne quasi-homogène sur toutes les illuminations

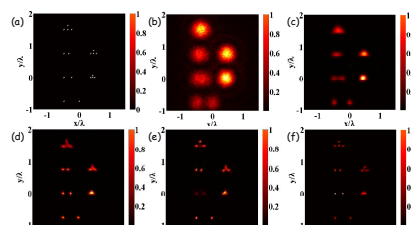
Reconstruction des données

N images P sont obtenues avec N intensités d'illumination I' . La densité de fluorophores est estimée itérativement de sorte à minimiser la fonction coût F . Un algorithme de gradient conjugué est utilisé pour résoudre ce problème linéaire d'inversion.

$$P(r) = (\rho \times I') \otimes psf, \quad I=1, \dots, N \quad F(\rho) = \sum_{I=1}^N |P_I - (\rho \times I_I) \otimes psf|^2 / \sum_{I=1}^N |P_I|^2$$

Illustration de l'amélioration de la résolution spatiale sur les substrats-réseaux : reconstruction de données numériques

(a) Échantillon théorique : sphères fluorescentes de diamètre 20 nm séparées de $\lambda/2, \lambda/4, \lambda/6, \lambda/8, \lambda/10$ et $\lambda/14$.
 (b) Simulation de l'image obtenue sur la caméra CCD sous illumination homogène (TIRFM)
 (c) Densité de fluorophores reconstruite par inversion itérative à partir de l'image (b).
 (d) Idem sous illumination en ondes stationnaires (SW-TIRF), (e) et sur le substrat-réseau en illumination à une onde (f) et à deux ondes.



A. Sentenac (2009) J Opt. Soc. Am. A, sous presse.

Développement instrumental

Un montage optique est en cours de développement sur la base d'un microscope TIRF.

Deux ondes planes sont créées par diffraction d'un faisceau laser sur un modulateur de phase à cristaux liquides (SLM) et focalisation des ordres +1 et -1 dans le plan focal arrière de l'objectif (bfp). Les angles θ_{inc} et φ et la phase Φ sont contrôlés par le SLM. La polarisation s est obtenue grâce au convertisseur de polarisation azimutale (PC).

