

## Réunion Projet SOURIS (11/01/2010)

Etat des recherches :

Volet Nano-Spot : pas de développement instrumental pour l'instant.

Volet Imagerie plein-champ :

- **Développement d'un montage optique de type TIRFM** (microscope de fluorescence en réflexion totale interne) sur la base d'un microscope inversé.
- **Optimisation du schéma d'illumination du substrat**, en utilisant une lame de verre standard au lieu d'un réseau résonant et en observant la réflexion du laser sur l'interface verre-air du substrat (illumination par une onde plane et par deux ondes planes contra propagatives). Les deux ondes planes contra propagatives sont générées au moyen d'un SLM (modulateur spatial de phase), sur lequel est affiché un réseau périodique de phase. Une série de lentilles (dont un objectif zoom) projette ce réseau dans le plan du substrat. L'ensemble permet de contrôler précisément les angles polaires et azimutaux d'incidence ainsi que la phase relative des deux ondes.

Problèmes rencontrés / Solutions proposées :

- **Dysfonctionnement du SLM**, raison probable : instabilité de l'alimentation secteur au 1<sup>er</sup> étage (aucun problème rencontré jusqu'ici au rez-de-chaussée). Un réseau de diffraction en transmission remplace désormais le SLM, lequel sera réintégré au montage pour le volet « nano-spot ».
- **Déplacement contrôlé du réseau de diffraction** pour assurer les rotations et translations de la figure d'interférence à la surface du substrat. *Solutions* : (1) réseau de diffraction fixé sur un jeu de platines motorisées ou piézo-électriques ; (2) (*retenue*) : utiliser la platine de microscope récemment achetée et testée par Serge, pour réaliser les translations en déplaçant simplement l'échantillon. Les rotations sont effectuées grâce au support de rotation manuel portant le réseau de diffraction.
- **Speckle** □ modulation spatiale du champ d'illumination structurée. *Solution* : brouiller la figure de speckle en injectant le faisceau en sortie du laser dans une fibre multimode et en agitant celle-ci durant l'acquisition. (1) Réaliser un test pour vérifier que les franges d'interférences subsistent et que leur contraste n'est pas dégradé. (2) Acheter un système d'injection adéquat (support fibre + collimateur).

Cartographie du champ structuré

- **SNOM** (microscopie de champ proche optique), collab. Frédérique de Fornel :
- o *Première série de mesures*, sur des échantillons de type réseaux non-enterrés : contraste trop faible pour distinguer une structuration périodique du champ. *Problèmes* : puissance d'illumination trop faible (rapport S/B trop bas) ; défauts de surfaces (interférences autour des défauts et endommagement de la sonde) ; intégration du champ sur une zone relativement étendue (en z) de la pointe.

- o *Deuxième série de mesures*, avec une source laser plus intense : mise en évidence du champ structuré attendu. Configuration d'illumination à une onde : l'analyse spectrale des images révèle une période du champ très proche de celle fixée par le réseau. Illumination à deux ondes : présence de plusieurs périodes dans le spectre indiquant l'existence d'un moiré comme prévu par le modèle.
- **STORM** (*stochastic optical reconstruction microscopy*)
- o Tests d'imagerie super-résolue par d-STORM (avec un seul type de fluorophores et une activation par voie chimique) effectués avec le CIML (cf. Serge) sur des échantillons cellulaires : permet une résolution de l'ordre de 10 nm. *Nécessaire pour un test sur les réseaux* : développement de la chimie de surface (greffage des fluorophores sur le silicium ou la résine sous laquelle sont enterrés les réseaux). *Difficulté* : permet uniquement une mesure qualitative de la distribution du champ à la surface du substrat. *Avantage* : sonde le champ à la surface du substrat (pas d'intégration en z comme en SNOM)
- **Inversion** : reconstruction de la distribution du champ à partir d'images de fluorescence de billes fluorescentes individuelles réparties quasi-aléatoirement sur le substrat. Développement de l'algorithme d'inversion (Emeric et Jules). *Difficulté* : (1) besoin de billes fluorescentes de taille petite (20 nm) devant la période du réseau, ne pouvant être détectées qu'avec une caméra EM-CCD, dont la taille des pixels est 16  $\mu\text{m}$  (contre 4  $\mu\text{m}$  pour une CCD standard) : localisation difficile des billes (1 tache d'Airy  $\sim$  2-3 pixels). (2) Les billes ne sont pas calibrées : une image sous illumination uniforme est nécessaire pour reconstruire ensuite la distribution du champ structuré à partir d'une seule image. *Solution* : utiliser l'ordre zéro du réseau. (3) Un modèle basé sur la décomposition en ondes planes ne permet pas de retrouver une dérive de phase dans le champ structuré (« glissement » des franges d'interférences), ni la présence de défaut localisés.

#### Prochaines étapes :

- Résoudre le problème du speckle sur le montage.
- Cartographier le champ d'illumination structuré, d'abord sur une lame nue avec 2 ondes, puis sur un réseau, à 1 puis 2 ondes, pour une seule position de la grille de lumière (pas de déplacement du réseau ni de l'échantillon). Méthodes : STORM et inversion avec les billes fluorescentes.
- Nouvelle série de mesures SNOM à Dijon sur les prochains réseaux produits au LPN (cf. Anne Talneau).
- Installer la platine XY sur le microscope et cartographier le champ d'illumination structuré pour différentes positions de la grille.
- Modéliser une méthode alternative, toujours basée sur les réseaux résonants, mais dans laquelle le champ d'illumination est homogène et la détection est spatialement sélective grâce à un filtrage dans l'espace de Fourier de la fluorescence collectée (cf. Anne et Patrick).

Le projet sera présenté aux Journées Optique Non-Conventionnelle (22-23/03/2010) à l'ESPCI (Paris) et au congrès Photonics Europe à Bruxelles (12-16/04/2010).