

Résumé

La microscopie de fluorescence optique est l'un des outils les plus puissants pour étudier les structures cellulaires et moléculaires au niveau subcellulaire. La résolution d'une image de microscope conventionnel à fluorescence est limitée par la diffraction, ce qui permet d'obtenir une résolution spatiale latérale de 200nm et axiale de 500nm. Récemment, de nombreuses techniques de microscopie de fluorescence de super-résolution ont été développées pour permettre d'observer de nombreuses structures biologiques au-delà de la limite de diffraction. La microscopie d'illumination structurée (SIM) est l'une de ces technologies. Le principe de la SIM est basé sur l'utilisation d'une grille de lumière harmonique qui permet de translater les hautes fréquences spatiales de l'échantillon vers la région d'observation du microscope. L'amélioration de la résolution de cette technologie de microscopie dépend fortement de la technique de reconstruction, qui rétablit les hautes fréquences spatiales de l'échantillon dans leur position d'origine. Les méthodes classiques de reconstruction SIM nécessitent une connaissance parfaite de l'illumination de l'échantillon. Cependant, l'implémentation d'un contrôle parfait de l'illumination harmonique sur le plan de l'échantillon n'est pas facile expérimentalement et il présente un grand défi. L'hypothèse de la connaissance parfaite de l'intensité de la lumière illuminant l'échantillon en SIM peut donc introduire des artefacts sur l'image reconstruite de l'échantillon, à cause des erreurs d'alignement de la grille qui peuvent se présenter lors de l'acquisition expérimentale. Afin de surmonter ce défi, nous avons développé dans cette thèse des stratégies de reconstruction «aveugle» qui sont indépendantes de l'illumination. À l'aide de ces stratégies de reconstruction dites «blind-SIM», nous avons étendu la SIM harmonique pour l'appliquer aux cas de «SIM-speckle» qui utilisent des illuminations aléatoires et inconnues qui contrairement à l'illumination harmonique, ne nécessitent pas de contrôle. Comme il est utile de récupérer des informations sur l'illumination en SIM harmonique, nous avons développé une reconstruction blind-SIM tridimensionnel et filtrée qui confine l'estimation itérative des illuminations au voisinage des pics dans l'espace de Fourier, en utilisant des masques de filtre de Fourier soigneusement conçus. En utilisant des techniques de reconstruction blind-SIM, une résolution latérale d'environ 100 nm et une résolution axiale d'environ 200 nm sont obtenues, à la fois en SIM harmonique et en SIM speckle. En outre, pour réduire le problème de focalisation dans les images de champ large, une technique de calcul simple qui repose sur la reconstruction bidimensionnel de données à partir de PSF tridimensionnel est développée. En outre, afin de combiner à la fois les fonctionnalités de la SIM et de la microscopie à nappe de lumière, en tant que preuve de concept, nous avons développé une configuration de microscope simple qui produit une nappe de lumière structurée.

Abstract

Optical fluorescence microscopy is one of the most powerful tools to study cellular structures and molecular events in subcellular level. The resolution of a conventional fluorescence microscope image is diffraction limited which achieves a spatial resolution of 200nm lateral and 500nm axial. Recently, many superresolution fluorescence microscopy techniques have been developed which allow the observation of many biological structures beyond the diffraction limit. Structured illumination microscopy (SIM) is one of them. The principle of SIM is based on using a harmonic light grid which downmodulates the high spatial frequencies of the sample into the observable region of the microscope. The resolution enhancement is highly dependent on the reconstruction technique, which restores the high spatial frequencies of the sample to their original position. Common SIM reconstructions require the perfect knowledge of the illumination pattern. However, to perfectly control the harmonic illumination patterns on the sample plane is not easy in experimental implementations and this makes the experimental setup very technical. Reconstructing SIM images assuming the perfect knowledge of the illumination intensity patterns may, therefore, introduce artifacts on the estimated sample due to the misalignment of the grid that can occur during experimental acquisitions. To tackle this drawback of SIM, in this thesis, we have developed blind-SIM reconstruction strategies which are independent of the illumination patterns. Using the 3D blind-SIM reconstruction strategies we extended the harmonic SIM to speckle illumination microscopy which uses random unknown speckle patterns that need no control, unlike the harmonic grid patterns. For harmonic-SIM images, since incorporating some information about illumination patterns is valuable, we have developed a 3D positive filtered blind-SIM reconstruction which confines the iterative estimation of the illuminations in the vicinity of the Fourier peaks (using carefully designed Fourier filter masks) in the Fourier space. Using blind-SIM reconstruction techniques a lateral resolution of about 100nm and axial resolution of about 200nm is obtained in both speckle and harmonic SIM. In addition, to reduce the out-of-focus problem in widefield images, a simple computational technique which is based on reconstructing 2D data with 3D PSF is developed based on blind-SIM reconstruction. Moreover, to combine the functionalities of SIM and light sheet microscopy, as a proof of concept, we have developed a simple microscope setup which produces a structured light sheet illumination pattern.