

Aix-Marseille University
Karlsruhe Institute of Technology
ECOLE DOCTORALE
UFR
Institut Fresnel / Equipe MOSAIC

Thèse présentée pour obtenir le grade universitaire de docteur

Discipline : ED 352 – PHYSIQUE ET SCIENCES DE LA MATIERE
Spécialité : Optique, Photonique et Traitement d'Image

Wei HE

Investigations of structural properties of biological cells in 3D using
polarization-resolved optical microscopy

Soutenue le 05/12/2016 devant le jury :

Heinz-S. Kitzrow	Prof.	Dr.	Rapporteur	
Antoine Delon	Prof.		Rapporteur	
Andreas-Neil Unterreiner	Priv.	Dr.	Examinateur	
Martin Bastmeyer	Prof.	Dr.	Examinateur	CoDirecteur de thèse
Patrick Ferrand	Dr.		Examinateur	Co-encadrant de thèse
Sophie Brasselet	Prof.		Directeur de thèse	

Aix-Marseille University

Abstract

Institute Fresnel
ED352

by Wei HE

Measuring molecular orientation properties is appealing for scientists in molecular and cell biology, as well as biomedical research. Orientational organization at the molecular scale is indeed an important brick to understand cells and tissues morphology, mechanics, functions and pathologies. Recent work has shown that polarized fluorescence imaging, based on 2D excitation polarization tuning in the sample plane, is able to quantify molecular orientational order in biological cell membranes at the sub-micrometric scale. In this work, we extend the application range of this technique to other bio-molecular assemblies, and to the 3D geometry, which is necessary to explore more complex biological structures. We demonstrate first the use of the 2D approach to study actin fibers of the cell cytoskeleton. To surpass the 2D limitations, we propose a scheme to provide excitation polarization tuning in 3D. The principle is based on the decomposition of any arbitrary 3D linear excitation into a polarization along the longitudinal z-axis, and a polarization in the transverse xy sample plane. These two components are generated in an interferometer with one arm generating radial polarization light (thus producing longitudinal polarization under high numerical aperture (NA) focusing), the other arm controlling a linear polarization in the transverse plane. We model the produced polarization state at the focus of the microscope objective and provide a complete experimental characterization of the method. This includes the necessary calibration of the interferometer, together with the analysis of the detected fluorescence modulation signals. This novel 3D polarized fluorescence microscopy is demonstrated on actin stress fibers in fibroblast cell suspended on 3D supporting pillars made of synthetic polymer structures. We finally explore its applicability to the cell membranes and to other actin based structures in drosophila embryos. This technique shows a great potential in 3D structural investigations in materials as well as in complex biological tissues which geometry is hard to control.

Abstract

Institute Fresnel

ED352

by Wei HE

Mesurer les propriétés d'orientation moléculaire est intéressant pour les chercheurs des domaines de la biologie moléculaire et cellulaire, ainsi qu'en biomédical. En effet, l'organisation orientationnelle à l'échelle moléculaire est une brique importante de la compréhension morphologique, mécanique, et des fonctions et pathologies des cellules et des tissus. Des travaux récents ont montré que l'imagerie de fluorescence polarisée, basée sur une modulation de la polarisation d'excitation en 2D dans le plan de l'échantillon, est capable de sonder l'ordre d'orientation moléculaire dans les membranes cellulaires biologiques à l'échelle sub-micrométrique. Dans ce travail, nous étendons le domaine d'application de cette technique à d'autres assemblages bio-moléculaires, et la géométrie 3D nécessaire pour l'exploration de structures biologiques plus complexes. Dans un premier temps, nous démontrons l'utilisation de la méthode 2D pour l'étude des fibres d'actine du cytosquelette cellulaire. Dans un second temps, nous proposons une technique pour surpasser les limites de l'approche 2D. Son principe est basé sur la décomposition d'une excitation linéaire 3D en une polarisation arbitraire le long de l'axe z longitudinal et une polarisation dans le plan transversal de l'échantillon xy. Ces deux composantes sont générées par un interféromètre dont un bras génère une polarisation radiale (produisant ainsi une polarisation longitudinale sous focalisation haute ouverture numérique (ON)), et l'autre bras contrôle la polarisation linéaire dans le plan transversal. Nous modélisons l'état de polarisation produit au point focal de l'objectif de microscopie et proposons une caractérisation expérimentale complète de la méthode. Ceci inclut les calibrations nécessaires de l'interférometre, ainsi que l'analyse de la modulation du signal détecté par fluorescence. Cette nouvelle méthode de microscopie fluorescence polarisée en 3D est enfin appliquée aux fibres de stress d'actine dans les cellules fibroblastes suspendues sur des piliers de support 3D fabriqués en structures polymères synthétiques. Nous explorons finalement l'application aux membranes cellulaires et des structures d'actine dans les embryons de drosophile. Cette technique a un grand potentiel pour la quantification structurale des matériaux ainsi que dans les tissus biologiques complexes, dont la géométrie n'est pas contrôlée.