
Sujet de thèse

Laboratoire: Institut Fresnel

Directeur de thèse : Loïc Le Goff, Email : legoff@fresnel.fr

Co-directeur : Anne Sentenac

Adresse : Institut Fresnel, Domaine Universitaire de Saint Jérôme, 13397 Marseille

Titre : Illumination structurée et ciblée pour la microscopie super-résolue.

Introduction

La biologie moderne utilise la microscopie de fluorescence pour imager de grands ensembles cellulaires à haute résolution, par exemple dans les embryons en développement. Pour ce faire, le microscope confocal de fluorescence est l'appareil le plus utilisé, mais sa résolution est limitée (transverse : 250 nm; axiale : 600 nm). Les microscopes super-résolus développés ces 20 dernières années permettent d'obtenir des résolutions sub-100 nm, mais leur complexité expérimentale, leur toxicité et surtout leur très grande sensibilité aux aberrations optiques les rendent relativement inadaptés à l'imagerie des tissus.

Nous avons proposé un nouveau type de microscope super-résolu adapté aux larges échantillons et peu toxique : le Random Illumination Microscope (RIM), dans lequel une image super-résolue de l'échantillon est reconstruite numériquement à partir d'une série d'images obtenues sous différents éclairagements de 'speckle'. Comme l'a démontré une première étude pilote, un traitement numérique approprié, permet d'obtenir une résolution axiale et transverse meilleure que celle d'un confocal [Mangeat 2021]. L'approche est relativement insensible aux aberrations, rendant la technique bien adaptée aux échantillons profonds.

Le projet de thèse

Le speckle étant une illumination 3D, de la fluorescence est générée en dehors du plan imagé, ce qui détériore la reconstruction, notamment lorsque le bruit de photon associé au fond devient important. L'objet de la thèse est de rendre la technique moins sensible au fond de fluorescence. Pour ce faire, nous proposons de développer un système optique permettant de concentrer l'illumination de speckle dans un sous-volume de l'échantillon adapté soit à la géométrie de l'objet d'étude (smart RIM) soit à la géométrie du microscope optique (light-sheet RIM) :

1-Smart-RIM: Les tissus biologiques sont des structures organisées dans l'espace. Par exemple, les embryons s'organisent souvent en mono-couches cellulaires courbes. L'étudiant utilisera un modulateur spatial de lumière afin de créer des motifs de speckle qui épousent les contours des objets biologiques imagés de façon non supervisée (Figure). Nous avons déjà démontré qu'une telle approche, adaptée au confocal, permet une forte réduction de la dose lumineuse (facteur 20x) [Abouakil 2021]. En microscopie RIM, un autre bénéfice sera l'amélioration de la reconstruction grâce à une forte diminution du bruit de fond.

2-Light sheet RIM : Le principe de la microscopie à feuille de lumière (light sheet) est de restreindre l'illumination au plan focal de l'objectif en développant une illumination plane, transverse à l'axe optique de l'objectif de détection. Cette configuration optique permettra de fortement réduire la fluorescence émise hors du plan focal –et donc réduire le fond. L'étudiant(e) concevra et implémentera le montage optique permettant la création d'une feuille de speckle. Dans un premier temps il/elle développera une telle feuille de speckle anisotrope car se propageant suivant une direction (taille des speckles $\Delta x > \Delta y$ lorsque le faisceau se propage suivant x). Dans un deuxième temps les conditions nécessaires à la création d'un speckle isotrope seront étudiées (taille des speckles $\Delta x = \Delta y$).

Au-delà de la réduction du fond, les deux approches complémentaires permettront de réduire fortement la dose lumineuse incidente sur l'échantillon et donc de rendre la technique moins toxique pour les tissus biologiques. L'approche sera appliquée à l'imagerie des tissus embryonnaires vivants ainsi qu'au cerveau transparisé du petit animal. L'approche Smart RIM est la suite directe de nos travaux antérieurs [Mangeat 2021, Abouakil 2021], de difficulté expérimentale moindre que le light-sheet RIM. En fonction de la volonté de l'étudiant(e), le Smart-RIM pourra être considéré comme la première étape, ou une solution de repli en cas d'échec sur le light sheet RIM.

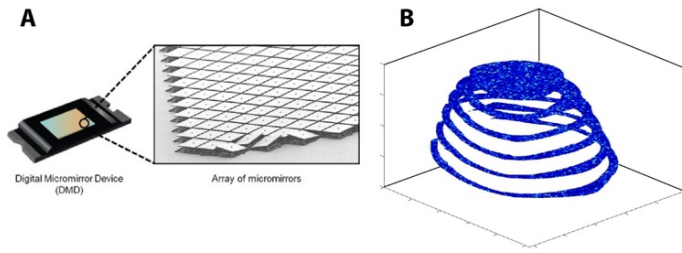


Figure : *Smart-RIM (A) Un DMD est une matrice de micro-miroirs qui placé dans un plan conjugué à l'échantillon permet de masquer spatialement l'éclairage. (B) Un DMD sera utilisé pour masquer le speckle d'illumination lors d'un scan en z afin de cibler la zone illuminée (par exemple, ici : une coque).*

Références :

Mangeat et al. Super-resolved live-cell imaging using random illumination microscopy. Cell rep methods (2021)

DOI: [10.1016/j.crmeth.2021.100009](https://doi.org/10.1016/j.crmeth.2021.100009)

Abouakil, F., Meng, H., Burcklen, MA. et al. An adaptive microscope for the imaging of biological surfaces. Light Sci Appl 10, 210 (2021). <https://doi.org/10.1038/s41377-021-00649-9>