

Université Paul Cézanne Aix-Marseille III

2005AIX30031

THÈSE

présentée et soutenue publiquement par

Nicolas SANDEAU

le 27 octobre 2005

pour obtenir le grade de

DOCTEUR EN SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ PAUL CÉZANNE

AIX-MARSEILLE III

Faculté des Sciences et Techniques

4π -microscopie : Applications à la localisation axiale de luminophores et à l'amélioration de la résolution latérale

Discipline : Optique électromagnétique et image

École Doctorale : Physique et Sciences de la Matière

Composition du Jury :

E. Beaufrepaire
A. Dubois (Rapporteur)
H. Giovannini (Directeur de thèse)
O. Haéberlé (Rapporteur)
S. Huard (Président du Jury)
H. Rigneault

Université Paul Cézanne Aix-Marseille III

2005AIX30031

THÈSE

présentée et soutenue publiquement par
Nicolas SANDEAU
le 27 octobre 2005

pour obtenir le grade de

DOCTEUR EN SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ PAUL CÉZANNE
AIX-MARSEILLE III
Faculté des Sciences et Techniques

4 π -microscopie : Applications à la localisation axiale de luminophores et à l'amélioration de la résolution latérale

Discipline : Optique électromagnétique et image
École Doctorale : Physique et Sciences de la Matière

Composition du Jury :

E. Beaufrepaire
A. Dubois (Rapporteur)
H. Giovannini (Directeur de thèse)
O. Haéberlé (Rapporteur)
S. Huard (Président du Jury)
H. Rigneault

Avant-propos

Ce travail, financé par une Allocation de Recherche MENRT¹, a été réalisé au sein de l'Institut Fresnel² (UMR CNRS 6133), dont je remercie ici tous les membres et notamment le Directeur Claude AMRA, pour leur accueil.

Je remercie vivement Arnaud DUBOIS et Olivier HAÉBERLÉ d'avoir accepté la lourde tâche d'être les rapporteurs de cette thèse. Je suis très sensible à l'honneur que me font les membres du jury de participer à l'évaluation de ce travail :

Emmanuel BEAUREPAIRE,
Arnaud DUBOIS,
Hugues GIOVANNINI,
Olivier HAÉBERLÉ,
Serge HUARD,
Hervé RIGNEAULT.

J'adresse particulièrement mes remerciements à Hugues GIOVANNINI pour la qualité de son encadrement, à Hervé RIGNEAULT pour son enthousiasme et à toute l'équipe Mosaïc pour leur motivation.

Je tiens vivement à remercier Jean-Pierre SPINELLI pour les pièces (innombrables), Frédéric FORESTIER pour "Titan 4", Gabrielle SORIANO et Patrick CHAUMET pour les codes Fortran.

Enfin, un grand merci à mes deux adorables collègues de bureau (Nadia et Laure), à Thomas et Marie pour leur présence pendant les longues et chaudes journées de rédaction du mois d'Août et à tous les autres thésards qui ont participé à l'ambiance des pauses café et des soirées. Et puis à plein d'autres : Marianne, David, Juliette. . .

¹Ministère de l'Éducation Nationale, de la Recherche et des nouvelles Technologies

²D.U. St-Jérôme 13397 Marseille cedex 20

Table des matières

Introduction	1
I <i>État de l'art</i>	3
1 La microscopie optique en Biologie	5
1.1 La cellule	6
1.2 La microscopie à fluorescence	6
1.3 Réduction du volume de détection	9
II <i>Localisation axiale de luminophores par interférométrie à faible longueur de cohérence</i>	15
2 Principe du montage	19
2.1 Description du principe du montage	19
2.2 PCI	21
2.3 Interféromètres couplés	23
2.4 Application à notre montage	26
2.5 Localisation d'un luminophore	28
2.6 Démodulation par un interféromètre de Linnik	30
3 Montage expérimental	33
3.1 Réglages et difficultés	33
3.2 Résultats préliminaires	35
3.3 Les échantillons	36
3.4 Résultats sur la fluorescence	39
3.5 Dispersion chromatique	41
3.6 Solutions et perspectives	44
3.7 Déplacement latéral de la source	45

III	<i>Calculs de diffraction dans un microscope Application au calcul de la résolution en microscopie confocale à fluorescence</i>	47
4	Diffraction dans un microscope	51
4.1	Le contexte	51
4.1.1	Focalisation du faisceau excitateur	52
4.1.2	Émission et collection de la fluorescence	52
4.2	Hypothèses et approximations	53
4.2.1	Hypothèses sur l'homogénéité de l'échantillon	53
4.2.2	Hypothèses sur les champs	54
4.2.3	Hypothèses sur le matériel	54
4.3	Calculs de diffraction dans un microscope	56
4.3.1	Focalisation du faisceau excitateur	56
4.3.2	La fluorescence	59
4.4	Quelques applications préliminaires	63
4.4.1	Détermination de l'orientation de molécules	63
4.4.2	Modification du volume d'excitation	66
5	Calcul de la résolution	69
5.1	Microscopie confocale de fluorescence	70
5.1.1	Description d'un microscope confocal classique	71
5.1.2	Hypothèses	72
5.1.3	Calcul de la MDE	73
5.2	4π -microscopie	87
5.2.1	La résolution dans un 4π -microscope de type A	90
5.2.2	La résolution dans un 4π -microscope de type C	92
5.2.3	4π -microscopie à deux photons	99
5.3	4π -microscope modifié	101
5.3.1	Description de la méthode	101
5.3.2	Calcul de la CEF	103
5.3.3	4π -microscope modifié à 1 ou 2 photons	108
5.3.4	Comparaison des volumes de détection	110
5.3.5	Application expérimentale	112
5.3.6	Microscopie à bioluminescence	112
	Conclusion	115

Introduction

En 1595, Zacharias Jansen semble avoir conçu le premier microscope à deux lentilles. Mais c'est en 1665 que Robert Hooke montre qu'un tel instrument peut être utile à la Biologie. Il observe alors, d'abord dans un morceau de liège puis dans des plantes vivantes, une structure compartimentée en "cellules". Il faut cependant attendre la fin du dix-neuvième siècle et l'invention de systèmes³ mieux corrigés des aberrations pour que le microscope devienne un instrument indispensable dans de nombreux domaines de la Biologie.

De nos jours, l'un des enjeux majeurs de la biologie moléculaire est de comprendre les mécanismes inter- et intra-cellulaires. Pour y parvenir, le moyen le plus intuitif reste l'observation directe de ces phénomènes sans les perturber. Avec l'apparition de sources LASER stables, d'objectifs à forte ouverture numérique et de photodétecteurs ultrasensibles, la microscopie à fluorescence permet d'étudier les cellules vivantes, leur comportement et leur fonctionnement. Néanmoins, cette technique de microscopie est encore limitée par sa sensibilité et son pouvoir de résolution. En effet, la moitié au moins de la fluorescence émise par l'échantillon n'est pas collectée par l'objectif de microscope et la résolution atteint au mieux la limite donnée par Abbe en 1873. Récemment pourtant, le couplage de deux (voire 4 et peut-être un jour 6) microscopes confocaux a permis non seulement de collecter la fluorescence dans toutes les directions de l'espace⁴ mais aussi d'améliorer d'un facteur cinq la résolution le long de l'axe optique. Au même moment, grâce au développement de caméras ultrasensibles et à l'apparition de luminophores très lumineux et moins sensibles à la photodestruction, de nouvelles techniques de suivi de particules ont été utilisées pour localiser des molécules participant spécifiquement à certains mécanismes, avec une précision nanométrique dans le plan focal de l'objectif de microscope. Dans ce contexte, nous avons décidé d'étudier le fonctionnement de plusieurs types de 4π -microscopes, pour résoudre deux problèmes : la localisation axiale des luminophores et l'amélioration de la résolution dans le plan focal des objectifs.

³Carl Zeiss a fabriqué et commercialisé le premier microscope "moderne" en 1891

⁴Ce système s'appelle un 4π -microscope.

La première partie est une introduction à la microscopie optique en Biologie pour rappeler brièvement les dimensions courantes des constituants d'une cellule et pour décrire quelques techniques de microscopie optiques.

La partie II est consacrée à la description de la méthode de localisation axiale de luminophores par interférométrie à faible longueur de cohérence dans un 4π -microscope. Cette partie est divisée en deux chapitres. Dans le chapitre 2, nous expliquons le principe de la méthode et décrivons les caractéristiques (avantages et inconvénients) de notre montage. Dans le chapitre 3, nous évoquons la procédure et les difficultés de réglage et nous discutons des résultats expérimentaux et des effets des aberrations chromatiques sur la mesure.

La partie III est aussi composée de deux chapitres. Le chapitre 4 est consacré aux calculs de la diffraction des champs d'excitation et d'émission dans un microscope. Dans un premier temps, nous nous intéressons au problème de la focalisation par un objectif à forte ouverture d'un faisceau polarisé puis à celui de l'imagerie d'un fluorophore à travers un système confocal. Ces calculs nous permettent, dans le chapitre 5, d'étudier la résolution, dans toutes les directions, de différents microscopes confocaux à fluorescence comme par exemple le 4π -microscope. Nous terminons ce chapitre en proposant un 4π -microscope modifié qui permet d'améliorer la résolution au-delà de la limite de diffraction.

Première partie

État de l'art

Chapitre 1

Introduction sur la microscopie optique en Biologie

Sommaire

1.1	La cellule	6
1.2	La microscopie à fluorescence	6
1.3	Réduction du volume de détection	9

Introduction

Depuis maintenant une cinquantaine d'années la biologie moléculaire repose sur une vision mécanistique où des processus de signalisation seraient à la base du comportement cellulaire (expression de gènes, mouvement, division cellulaire . . .). Bien que représentée par des schémas structurés et cohérents, la propagation de l'information dans la cellule reste mal connue tant sur le plan spatial (Où se localise le flux du signal?), temporel (Quelle est la dynamique des différentes entités moléculaires?) que structural (Y a-t-il changement de structure à l'échelle nanométrique?). La connaissance précise de ces flux d'informations moléculaires dans la cellule est délicate à obtenir car ceux-ci impliquent souvent plusieurs partenaires de taille nanométrique et s'opèrent à des échelles spatio-temporelles variées. Dans ce contexte, les instruments à développer doivent donc présenter trois caractéristiques bien particulières :

- *une grande sensibilité* car les concentrations moléculaires utiles au processus de signalisation sont souvent très faibles ;

- *un grand pouvoir de résolution spatiale et temporelle* pour distinguer les processus les uns des autres ;
- *et une innocuité* vis-à-vis de la cellule. En effet, toute perturbation peut entraîner des modifications dans les mécanismes observés.

Ainsi, les techniques de microscopie électronique qui offrent pourtant des résolutions nanométriques ou celles à sondes locales (SNOM¹, AFM²) ne conviennent pas parce qu'elles ne permettent pas (ou n'ont pas encore permis) de travailler avec des cellules vivantes. Actuellement, les techniques de microscopie optique en champ lointain réalisent le meilleur compromis entre les trois caractéristiques décrites précédemment, même si la résolution spatiale reste l'un des facteurs limitants.

1.1 La cellule

En bref, nous pouvons dire qu'une cellule présente un diamètre moyen de 20 micromètres, elle est délimitée par une membrane plasmique constituée d'une bi-couche lipidique d'épaisseur inférieure à 5 nanomètres. L'espace intracellulaire est compartimenté en organelles (le noyau, le reticulum endoplasmique, l'appareil de Golgi. . .). Parmi ces constituants, les protéines, pour la plus part d'une taille de quelques nanomètres, ont une structure tridimensionnelle qui joue un grand rôle dans leur fonction. Elles peuvent être localisées dans l'espace intra-cellulaire ou comme le montre la figure 1.1, dans la membrane. Ce sont les différentes échelles spatiales mais aussi temporelles rencontrées dans la cellule d'étude qui imposent les caractéristiques des outils à utiliser. Plusieurs problèmes se posent :

- les dimensions des objets à observer ;
- le contraste de ces objets. . .

1.2 La microscopie à fluorescence

La condition nécessaire pour voir un objet est qu'il soit contrasté. Le contraste optique peut avoir diverses origines, il faut simplement discerner l'objet du milieu qui l'entoure. La microscopie classique en champ clair s'appuie essentiellement sur les effets d'absorption et de réfraction de l'échantillon. Parce que les cellules sont transparentes, de nombreuses techniques ont été mises au point afin d'augmenter le contraste des objets cellulaires. Nous

¹"*Scanning Near-field Optical Microscope*"

²"*Atomic Force Microscope*"

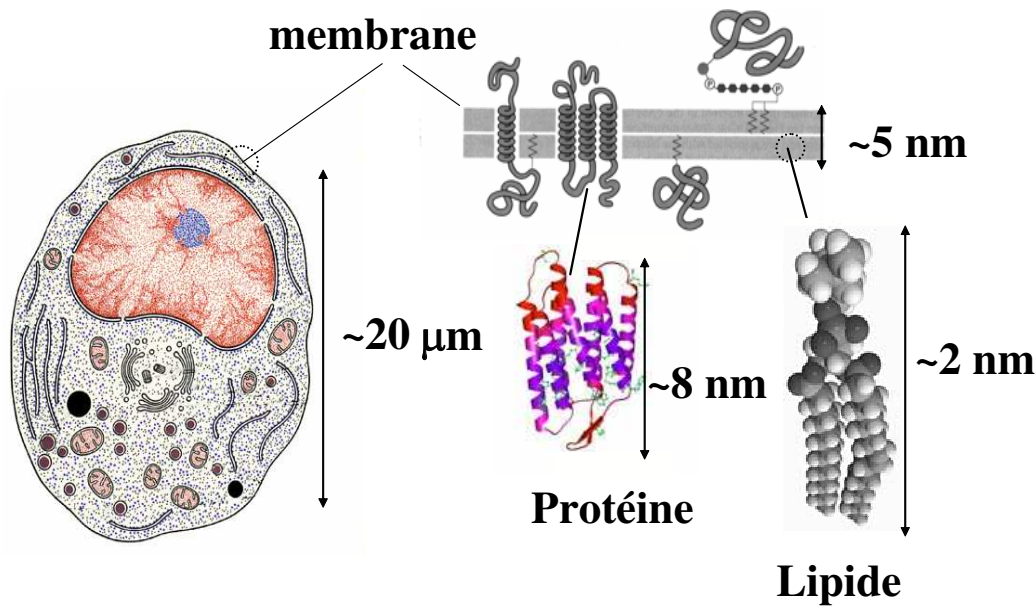


FIG. 1.1 – Une cellule animale et ses composants.

n'en citerons que deux : la microscopie en *champ noir* et celle à *contraste de phase* (DIC^3). Nous ne détaillerons pas ces techniques mais le lecteur intéressé pourra se rapporter à un ouvrage de référence tel que celui de Murphy [1].

Le contraste de fluorescence

La fluorescence⁴ apparaît aujourd'hui comme un des moyens les plus efficaces pour faire apparaître les objets biologiques. La technique consiste à marquer avec un fluorophore (ou d'autres types de luminophores comme par exemple les nanocristaux) une espèce de molécule utilisée dans le processus d'étude. Ces fluorophores ont la propriété d'émettre une radiation lumineuse lorsqu'ils sont photo-activés. La représentation de ce phénomène dans l'espace des énergies est décrite par les courbes (a) et (b) de la figure 1.2. Lorsque un (a) ou plusieurs (b) photons d'énergie équivalente à la transition électronique ($S_0 \rightarrow S_1$), sont absorbés par ce type de molécules il peut y avoir émission d'un photon légèrement moins énergétique. Le décalage de Stokes

³"Differential Interference Contrast"

⁴La fluorescence est un cas particulier de luminescence qui regroupe les divers processus d'émission de lumière.

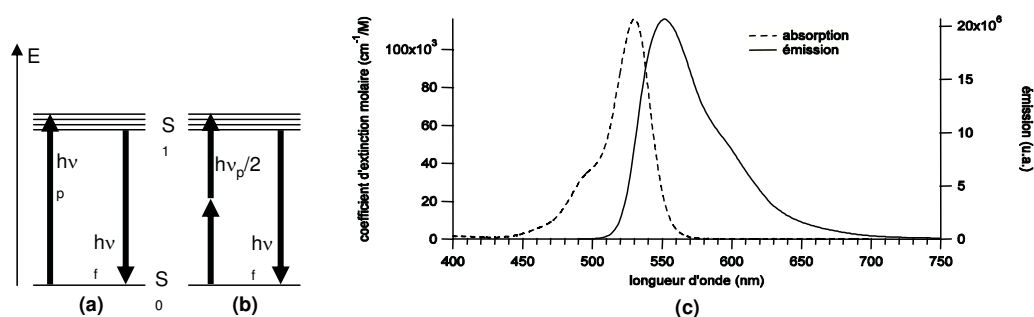


FIG. 1.2 – Diagramme de Jablonski représentant le processus de fluorescence à 1 photon (a), et à 2 photons (b). Spectre d'absorption et d'émission typique d'un fluorophore (c).

correspond à ce décalage spectral représenté par l'écart entre les maxima des deux spectres (d'absorption et d'émission) de la figure 1.2 (c). A l'aide de filtres, il est donc possible de séparer la lumière provenant de l'excitation de celle émise par les fluorophores de sorte que seules les molécules d'intérêts apparaissent à l'image. Remarquons que cette technique à d'autant plus d'intérêt que des protéines fluorescentes [2] (comme la GFP⁵) peuvent être fusionnées à la protéine étudiée par modifications génétiques.

Le contraste de temps de vie

Il est à remarquer que les molécules fluorescentes ont tendances à être photo-détruites au cours du temps, ce temps de vie peut être utilisé pour générer un contraste; le FRET⁶ tire parti de ce phénomène qui semblait a priori être un inconvénient. De même les chromophores se désexcitent plus ou moins rapidement selon leur type et leur environnement; la technique de FLIM⁷ mesure ces temps⁸ de désexcitation radiative.

La microscopie non-linéaire

Certaines interactions Lumière-matière sont de plus en plus utilisées pour l'imagerie. La raison vient de l'apparition récente de sources Laser fiables permettant d'émettre des impulsions ultra-brèves présentant des puissances

⁵ "Green Fluorescent Protein"

⁶ "Fluorescence Resonant Energy Transfert"

⁷ "Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy"

⁸ Ces temps sont de l'ordre de la nanoseconde.

crêtes importantes. Elles ont l'avantage considérable de ne pas nécessiter de marquage puisque c'est la molécule d'intérêt qui est directement excitée. Nous ne citerons que les trois principales techniques qui utilisent ces phénomènes : la génération du second harmonique [3], la génération du troisième harmonique [4] et la microscopie Raman stimulée (CARS⁹) [5]. Notons que dans la suite, nous aborderons un autre phénomène non-linéaire : l'absorption par un fluorophore de plusieurs photons simultanément (Cf. fig.1.2 (b)). Nous parlerons alors de microscopie fonctionnant en régime d'excitation à deux [6,7], trois [8] photons. . . Toutes ces méthodes de microscopie non-linéaire utilisent des faisceaux excitateurs dans l'infrarouge proche, ce qui permet de travailler dans des échantillons diffusants plus épais.

1.3 Réduction du volume de détection

C'est à la fin du dix-neuvième siècle que Abbe et Rayleigh ont montré que la résolution des microscopes était limitée par les lois de la diffraction [9, 10]. Il est, en effet, impossible de distinguer deux objets identiques séparés par une distance plus petite que la limite de diffraction¹⁰ avec un microscope dit "classique". Néanmoins, cette forme de microscopie n'interdit ni la détection ni la localisation de molécules fluorescentes individuelles (cf. chapitre 2). Nous avons vu qu'en Biologie cellulaire, la méthode la plus couramment utilisée est la microscopie confocale à fluorescence. La résolution du système est alors directement liée à un volume d'efficacité de détection qui dépend à la fois des propriétés du faisceau exciteur et du système optique de collection de la lumière (cf. chapitre 5). Jusqu'à présent, tandis que de nombreux efforts ont été menés pour réduire le volume d'excitation (polarisation et forme du faisceau) quasiment rien n'a permis de réduire le volume d'efficacité de collection. En effet, seul un trou¹¹ placé devant le photodétecteur et adapté à la tache de diffraction, limite axialement le volume de détection. Tous ces volumes sont déterminés par les lois de la diffraction, nous verrons donc que l'expérimentateur a tout intérêt de travailler avec un objectif à forte ouverture et des longueurs d'ondes (excitation et émission) les plus petites possibles. Il faut cependant remarquer qu'un rayonnement trop énergétique (proche ultraviolet) n'est pas sans conséquence pour la cellule. De plus la gamme des fluorophores non-toxiques pour la cellule limite la longueur d'onde d'émission au vert ($\sim 500 \text{ nm}$). Récemment différentes méthodes sont apparues pour

⁹"Coherent Anti-Stokes Raman Scattering"

¹⁰Abbe et Rayleigh ont montré que cette distance est proportionnelle au rapport de la longueur d'onde d'émission sur l'ouverture numérique des objectifs.

¹¹Ce trou est appelé trou confocal ou sténopé.

réduire le volume de détection. Nous ne citerons que les trois principales :

- l’excitation par des ondes évanescentes (TIRF¹²) ;
- la déplétion stimulée de l’émission (STED¹³) ;
- le couplage de plusieurs microscopes confocaux.

La microscopie TIRF

Généralement les échantillons biologiques sont en solution aqueuse, l’indice du milieu est donc proche de $n=1.33$. La microscopie de fluorescence par réflexion totale interne (TIRF) consiste à venir exciter les fluorophores de l’échantillon avec des ondes évanescentes issues de la réflexion totale du faisceau excitateur à l’interface entre la lamelle et l’eau. En effet, lorsque un faisceau arrive sur une interface entre deux milieux d’indices n_1 et n_2 ($n_1 > n_2$), avec un angle θ supérieur à l’angle critique de réflexion, une onde évanescente (de longueur d’onde λ) pénètre le deuxième milieu sur une épaisseur :

$$d = \frac{\lambda}{4\pi\sqrt{(n_1 \sin \theta)^2 - n_2^2}} \quad (1.1)$$

Plusieurs méthodes permettent de créer un champ évanescent [11]. La figure 1.3 décrit les deux principales. En **(a)**, un prisme fonctionnant en réflexion totale, est placé au dessus de l’échantillon tandis que la fluorescence est collectée par l’objectif placé sous l’échantillon. En **(b)**, un objectif à très forte ouverture numérique ($NA > 1.33$) vient focaliser le faisceau excitateur et collecter la fluorescence. Olympus commercialise par exemple un objectif d’ouverture $NA = 1.65$ dans un liquide d’indice $n = 1.78$. Dans ce cas, la formule (1.1) nous permet d’estimer la longueur axiale du volume d’excitation à $\lambda/12$. La figure 1.4 montre l’amélioration apportée par la méthode TIRF sur des images de neurones par rapport à la microscopie confocale classique.

La microscopie STED

Actuellement la déplétion par émission stimulée (STED) est la méthode qui permet de réduire le plus le volume de détection. Hell et al. prétend obtenir une résolution inférieure à 20 nanomètres [12]. Dès 1994, il a été proposé par Hell et al. d’utiliser la saturation d’une transition entre deux états électroniques pour empêcher localement l’émission de la fluorescence [13]. La figure 1.5 nous montre qu’une première impulsion focalisée vient exciter

¹² "Total Internal Reflection Fluorescence Microscopy"

¹³ "Stimulated Emission Depletion"

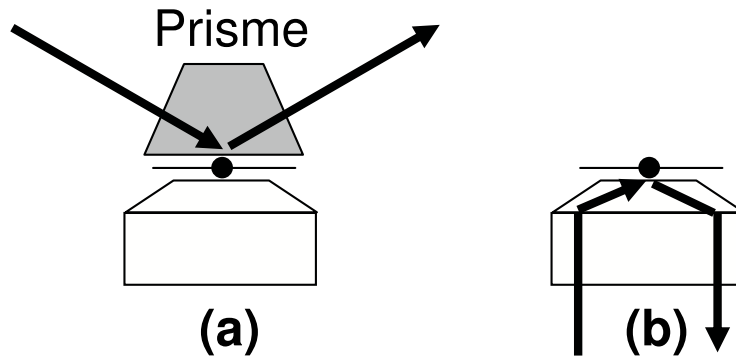


FIG. 1.3 – Deux techniques de microscopie TIRF. En (a), un prisme fonctionnant en réflexion totale, est placé au dessus de l'échantillon. Le champ évanescent ainsi créé vient exciter les fluorophores. La fluorescence est collectée par un objectif (sous l'échantillon). En (b), un objectif à très forte ouverture numérique ($NA > 1.33$) vient focaliser le faisceau excitateur et collecter la fluorescence. Ce faisceau a généralement une forme d'anneau (sombre au centre) de sorte que seules les hautes fréquences soient focalisées.

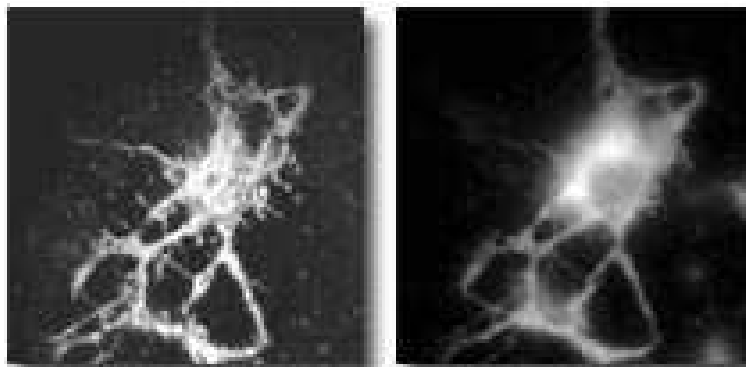


FIG. 1.4 – Images de Neurones réalisées avec la méthode TIRF (à gauche) et avec un microscope confocal classique (à droite). Les images viennent du site www.olympusmicro.com

les fluorophores puis une deuxième en forme de "bouée" (présentant une intensité nulle au foyer) a tendance à les stimuler vers leur état fondamental. Ainsi seuls les fluorophores se trouvant dans les environs du foyer émettent le signal de fluorescence. Il est à remarquer que c'est un effet non-linéaire dans la déplétion qui permet d'atteindre de tels résultats. Cette technique semble, toutefois, avoir deux défauts majeurs. En effet, l'utilisation du STED avec des fluorophores de couleurs différentes reste (par conception) difficile et l'utilisation de très fortes intensités endommage la plupart des échantillons biologiques. Néanmoins ces deux points peuvent ne pas être gênants dans d'autres domaines que la biologie comme la microélectronique [14].

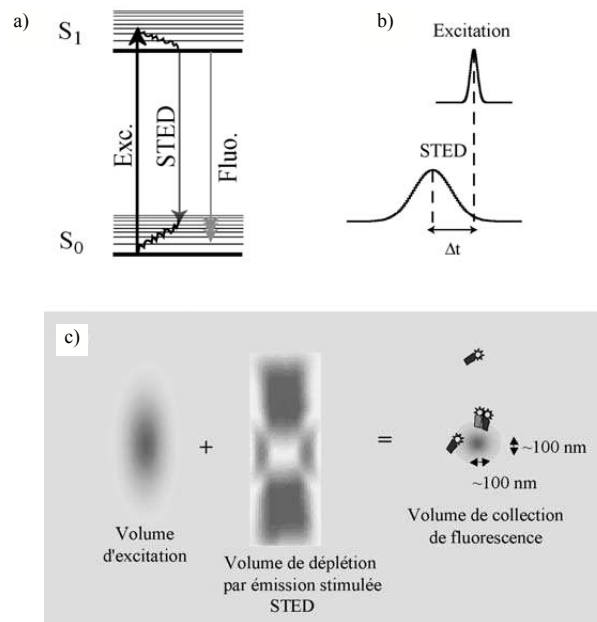


FIG. 1.5 – Principe de la microscopie par émission stimulée de fluorescence (STED). (a) Diagramme d'énergie d'un fluorophore. Une molécule excitée dans un état S_1 peut revenir vers un état fondamental S_0 par émission spontanée (la fluorescence) ou par émission stimulée. (b) Pour que le processus stimulé l'emporte sur le processus spontané et que la déplétion soit saturée, les impulsions STED doivent être intenses et plus courtes que le temps de vie de fluorescence de la molécule dans S_1 . Les impulsions d'excitation et de déplétion sont synchronisées mais décalées temporellement pour permettre le peuplement de S_1 avant sa déplétion. (c) Au faisceau d'excitation confocal est superposé le faisceau de déplétion qui possède une zone centrale d'intensité nulle. Extrait de "La nanophotonique" [15].

La microscopie à plusieurs objectifs

Au début des années 1990, Hell a eu l'idée de coupler deux microscopes confocaux¹⁴ pour améliorer la résolution axiale des microscopes optiques. Dans le montage décrit par Hell et al. [16] (cf. fig. 1.6 (a)) et dans celui de Sheppard et al. [17] (cf. fig. 1.6 (b)), deux objectifs à forte ouverture numérique se font face de sorte que la fluorescence soit collectée quasiment dans toutes les directions (sur 4π stéradians); d'où le nom de 4π -microscope (Cf. figure 1.7 (a)). Dans ces deux types de microscopes, deux faisceaux se propagent contrapropagativement pour interférer au voisinage de l'échantillon. Dans le chapitre 5.2, nous verrons que le réseau de franges ainsi obtenu, structure la tache de focalisation et permet d'augmenter la résolution axiale d'un facteur 5 environ. Le 4π -microscope en forme de triangle (de Hell¹⁴) commercialisé par Leica (Cf. fig. 1.6 (a)) permet aussi de faire interférer les signaux de fluorescence collectés par chaque objectif; ce microscope est appelé 4π -microscope de type C par opposition aux types A et B qui respectivement ne font interférer que l'excitation ou que l'émission. Nous verrons, dans le chapitre 2, qu'il est possible de modifier le microscope proposé par Sheppard (qui est de type A) pour qu'il soit aussi de type C.

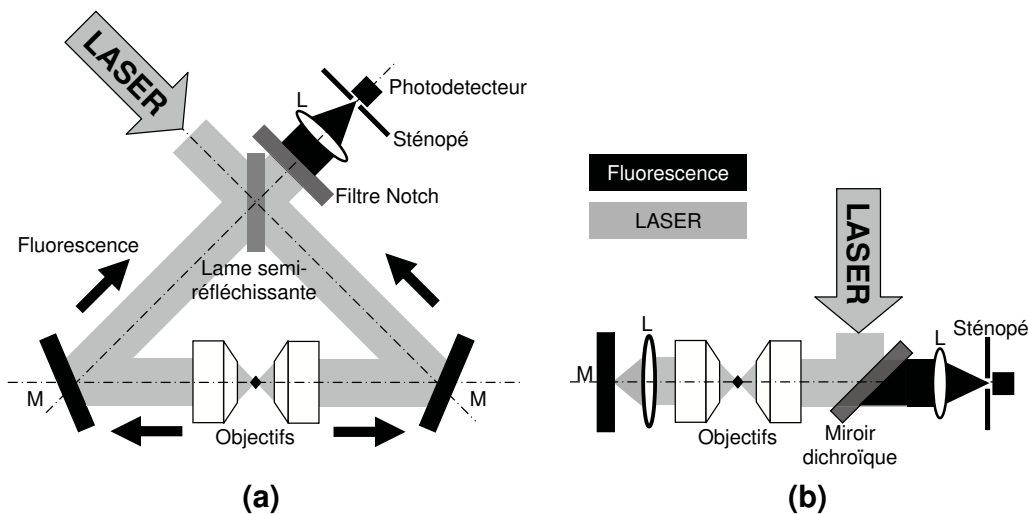


FIG. 1.6 – 4π -microscopes proposés en (a) par Hell et en (b) par Sheppard.

Un autre type de microscope à deux objectifs a été développé par Stelzer et Lindek : le ϑ -microscope (Cf. figure 1.7 (b)). Dans ce cas, l'axe d'illumination et celui d'observation forment un angle ϑ [18–20]. Le gain

¹⁴European Patent EP0491289, (24-06-1992), Classification : G02B21/00M4A

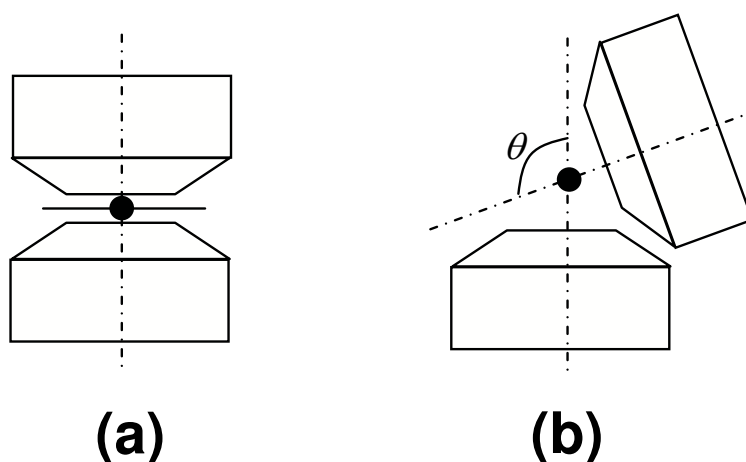


FIG. 1.7 – Microscopes à 2 objectifs. En (a) : 4π -microscope. En (b) : ϑ -microscope.

de résolution est toujours le long de l'axe optique, il atteint un facteur 3,5. Notons que ce type de microscopes permet de travailler sans trou confocal [21] et d'être couplé à un 4π -microscope¹⁵ [22]. Deux versions plus complexes, à quatre et à six objectifs ont respectivement été réalisées par Swoger et al. [23] et par Haeberlé et al. [24] ; elles améliorent sensiblement la résolution mais ne permettent ni de travailler avec des échantillons volumineux, ni d'être réglées facilement par des non-spécialistes. Remarquons enfin, qu'il existe aussi des versions de 4π - et de ϑ -microscopes à un objectif et à un miroir [25,26] ; elles ne semblent pas bien adaptées à l'imagerie mais sont utiles dans d'autres domaines (FCS¹⁶, ...).

Conclusion

Dans les chapitres suivants nous nous intéresserons particulièrement aux 4π -microscopes. Dans la partie II, nous décrirons comment nous avons modifié le 4π -microscope proposé par Sheppard pour obtenir un 4π -microscope de type C qui nous permet de localiser axialement les lumino-phores. Ensuite dans la partie III, nous calculerons la résolution de différents types de microscopes confocaux et notamment de 4π -microscopes. Enfin nous proposerons une méthode pour augmenter leur résolution en particulier dans le plan transverse à l'axe optique.

¹⁵Le microscope est alors formé de trois objectifs.

¹⁶"Fluorescence Correlation Spectroscopy"

Deuxième partie

Localisation axiale de luminophores par interférométrie à faible longueur de cohérence

Introduction

Grâce au développement de caméras ultrasensibles, les méthodes permettant de localiser et de suivre des molécules uniques sont en plein essor. Cependant toutes ces techniques, très efficaces pour localiser les sources situées dans le plan focal de l'objectif, sont réellement limitées lorsque les sources se déplacent le long de l'axe optique. Dans cette partie, nous allons nous intéresser à la localisation axiale de luminophores par interférométrie à faible longueur de cohérence dans un 4π -microscope proche du modèle proposé par Sheppard et al. (cf. fig. 1.6 **(b)**). Dans le chapitre 2, après avoir expliqué la technique d'interférométrie à faible longueur de cohérence, nous décrirons le principe de l'expérience que nous avons menée. Nous détaillerons les multiples avantages du montage mais aussi ses inconvénients. Le chapitre 3 sera consacré à la procédure de réglage, aux résultats expérimentaux et à une discussion sur l'influence des aberrations chromatiques sur la qualité de nos mesures. Enfin, nous terminerons en abordant les effets d'un déplacement de la source dans le plan focal de l'objectif. Cette étude nous amènera (dans le chapitre 4) à étudier en détail la diffraction dans un microscope.

Chapitre 2

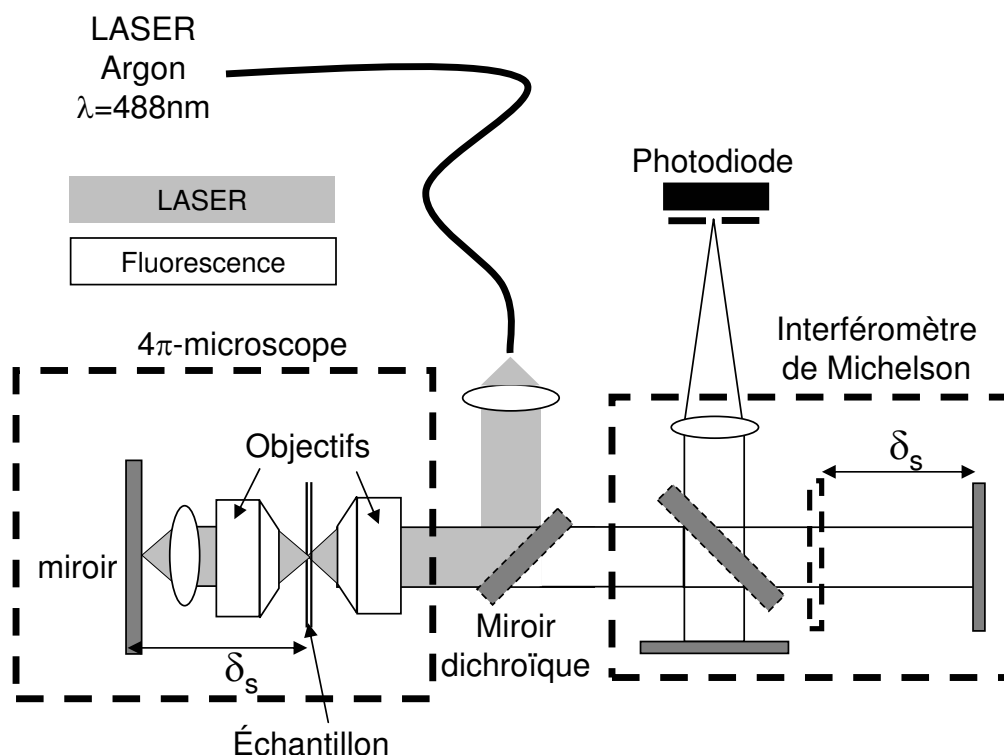
Principe du montage

Sommaire

2.1	Description du principe du montage	19
2.2	PCI	21
2.3	Interféromètres couplés	23
2.4	Application à notre montage	26
2.5	Localisation d'un luminophore	28
2.6	Démodulation par un interféromètre de Linnik	30

2.1 Description du principe du montage

Notre montage représenté à la figure 2.1 est un 4π -microscope particulier qui, nous le verrons, sert à localiser axialement les luminophores [27]. Bien qu'il soit basé sur un montage proposé par Sheppard et al. [17], il a été inspiré par l'expérience de microscopie sur miroir menée par Etienne et al. [28, 29]. Comme tout microscope confocal à fluorescence, notre système est constitué d'un faisceau excitateur complètement réfléchi par un miroir dichroïque et focalisé par un objectif de microscope. Ce faisceau est collecté par un deuxième objectif de microscope, réfléchi par un miroir et refocalisé par l'objectif sur l'échantillon, de façon à créer une succession de franges brillantes et sombres (le long de l'axe optique) dans la zone d'excitation. Dans cette configuration, pour qu'il y ait des interférences, nous verrons que la source excitatrice doit avoir un spectre assez étroit. En effet, sa longueur de cohérence doit être supérieure à la distance aller-retour parcourue par le faisceau entre le foyer de l'objectif et le miroir. Les fluorophores situés

FIG. 2.1 – *Principe du montage expérimental.*

au voisinage du foyer ont donc une forte probabilité d'être excités et donc d'émettre un signal dans tout l'espace. La fluorescence émise vers la droite (sur la figure 2.1) est directement collectée par l'objectif de droite et complètement transmise par le miroir dichroïque vers la sortie du microscope. Celle émise vers la gauche est aussi collectée par un objectif à forte ouverture numérique puis réfléchi pour être refocalisée sur l'échantillon. En sortie du bloc nommé 4π -microscope sur la figure 2.1, le champ est donc la somme de ces deux faisceaux¹ de fluorescence. Étant donné que la différence de marche introduite par le 4π -microscope est très supérieure à la longueur de cohérence des fluorophores, les interférences entre ces deux faisceaux de fluorescence seront brouillées et donc peu contrastées. C'est pourquoi, nous utilisons un interféromètre de Michelson qui permet de compenser cette différence de marche et donc d'augmenter le contraste des interférences entre les champs émis de chaque côté d'un même luminophore, au niveau du photodétecteur. Nous expliquerons, dans la suite, comment ces interférences nous

¹L'un est émis vers la gauche et l'autre vers la droite sur la figure 2.1.

permettent de localiser la source avec une grande précision. Remarquons qu'il existe d'autres types de microscopes interférométriques (interféromètres de Linnik ou de Mirau) utilisés pour faire des images tomographiques de tissus biologiques [30] ou de microcircuits imprimés [31–33]. Dans notre montage, nous avons décidé d'utiliser un interféromètre de Michelson pour des raisons de commodité de réglage mais nous verrons dans le paragraphe 2.6 qu'il peut être intéressant de remplacer cet interféromètre de Michelson par un interféromètre de Linnik.

2.2 Interférométrie à faible longueur de cohérence

Les fluorophores sont des sources à spectre relativement large. La courbe continue de la figure 2.2 nous montre le spectre d'émission de la Rhodamine 6G. Son maximum est autour de 550 nanomètres. Sa largeur atteint 100 nanomètres à 20% du maximum. Lorsqu'un interféromètre à deux ondes

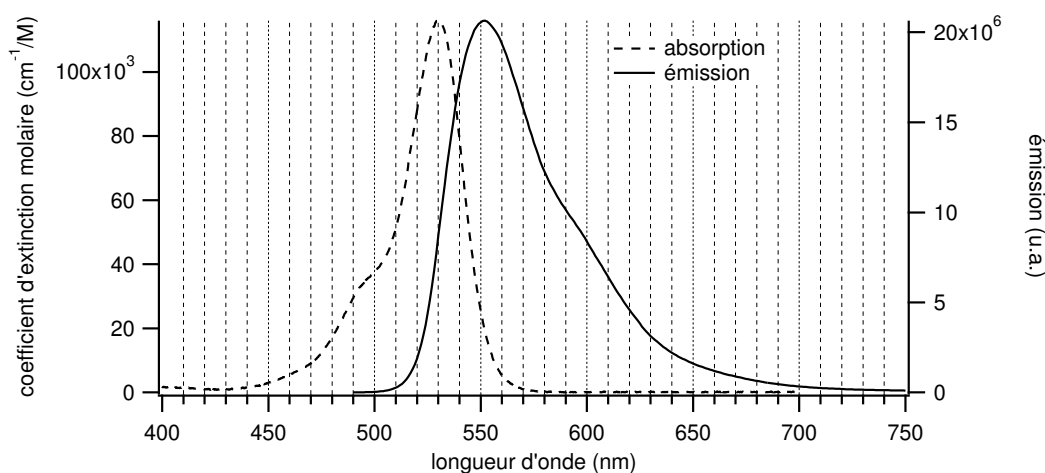


FIG. 2.2 – Spectres d'absorption (courbe en pointillés) et d'émission (courbe continue) de la Rhodamine 6G.

(par exemple un interféromètre de Michelson) est éclairé par une source à spectre large, le contraste des interférences décroît quand la différence de marche augmente. Ce phénomène est dû à un brouillage des franges de différentes couleurs. Nous parlons dans ce cas d'interférométrie à faible longueur

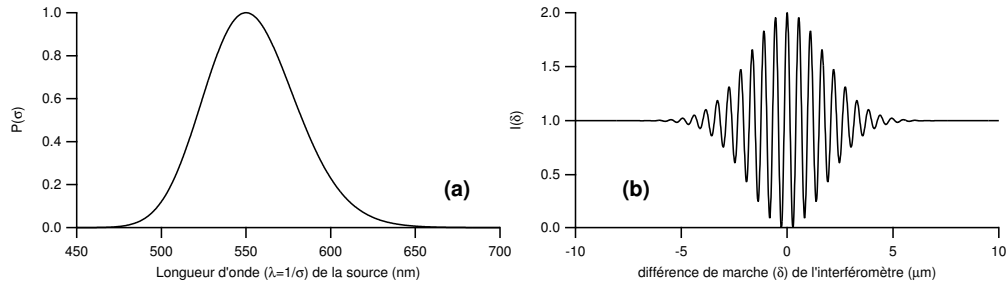


FIG. 2.3 – La source a un spectre gaussien ($\sigma_0 = 1/550 \text{ nm}^{-1}$ et $\Delta_\sigma = 1/8000 \text{ nm}^{-1}$) proche de celui de la Rhodamine 6G. (a) représente le spectre et (b) l'interférogramme de la source.

de cohérence (PCI)². A la sortie d'un interféromètre de Michelson, l'intensité lumineuse dépend de la différence de marche introduite par l'interféromètre et de la longueur d'onde de la source. En supposant que les deux bras de l'interféromètre de Michelson sont équilibrés,

$$I(\delta, \sigma) = P(\sigma) [1 + \cos(k \delta)] \quad (2.1)$$

avec $k = 2\pi\sigma$, $\sigma = 1/\lambda$ et $P(\sigma)$ la densité spectrale du flux incident. L'interférogramme d'une source à spectre large est donc représenté par la fonction :

$$I(\delta) = \int P(\sigma) [1 + \cos(k \delta)] d\sigma. \quad (2.2)$$

Il est donc formé de deux termes : l'un ne dépend pas de la différence de marche du démodulateur, l'autre est la partie réelle de la transformée de Fourier du spectre de la source. Plaçons nous dans un cas simple, supposons que le spectre de la source est décrit par une fonction gaussienne du type

$$P(\sigma) \propto \exp \left[- \left(\frac{\sigma - \sigma_0}{\Delta_\sigma} \right)^2 \right]. \quad (2.3)$$

Dans ce cas, le calcul de l'interférogramme peut se faire de manière analytique :

$$I(\delta) \propto 1 + \cos(2\pi\sigma_0\delta) \exp [-(\pi\Delta_\sigma\delta)^2]. \quad (2.4)$$

La figure 2.3 est un exemple de source à spectre gaussien ($\sigma_0 = 1/550 \text{ nm}^{-1}$ et $\Delta_\sigma = 1/8000 \text{ nm}^{-1}$). Nous définissons la longueur de cohérence L_c de

²De l'expression anglaise "Partial Coherence Interferometry".

la source comme la distance à partir de laquelle le contraste des franges de l'interférogramme devient inférieur à $1/e^2 \approx 13.5\%$ du maximum. Notons qu'il est fréquent de faire l'approximation :

$$Lc = \frac{\lambda_0^2}{\Delta_\lambda} \quad (2.5)$$

avec λ_0 la longueur d'onde centrale du spectre gaussien (en λ) et Δ_λ sa largeur à mi-hauteur. Au delà de cette longueur de cohérence, nous parlons classiquement de blanc d'ordre supérieur ; son spectre est cannelé.

La mesure d'un interférogramme peut donc permettre de remonter simplement (en calculant sa transformée de Fourier) au spectre de la source. La spectrométrie à transformée de Fourier [34, 35] utilise ce principe.

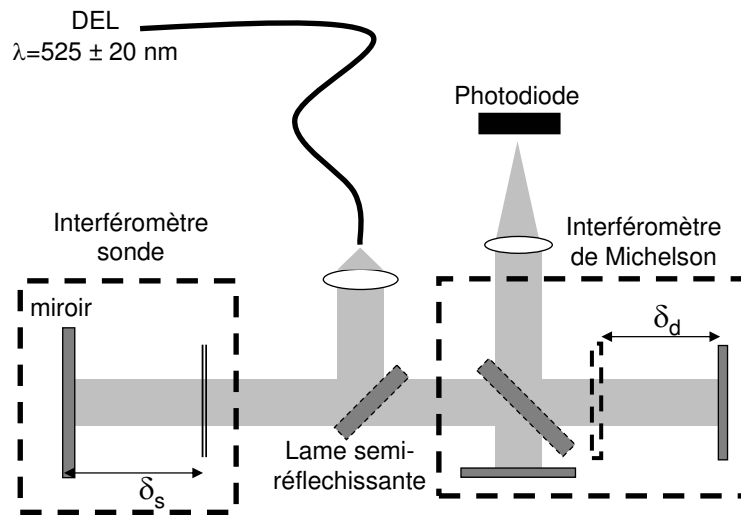


FIG. 2.4 – Un interféromètre sonde (constitué d'une lame partiellement réfléchissante parallèle à un miroir) est éclairé par une source à spectre large. La longueur de cohérence de la source est inférieure à la différence de marche δ_s introduite par l'interféromètre sonde. Un interféromètre de Michelson utilisé comme démodulateur, nous permet de mesurer précisément la distance δ_s .

2.3 Interféromètres couplés

Dans le montage représenté à la figure 2.4, un interféromètre (sonde), constitué d'une lame partiellement réfléchissante située à une grande distance

d'un miroir, est éclairé par une diode électroluminescente à spectre large. La différence de marche δ_s introduite par cet interféromètre (sonde) est très supérieure à la longueur de cohérence de la source. Les faisceaux réfléchis par la lame et par le miroir n'interfèrent donc pas avant d'entrer dans le deuxième interféromètre. Notons le coefficient de réflexion d'une des faces de la lame α , l'autre est complètement transparente. A la sortie de l'interféromètre sonde, le champ s'écrit donc :

$$E(\sigma, \delta_s) = E_0(\sigma) \left[\alpha + \frac{(1 - \alpha)^2 (e^{ik\delta_s} - \alpha)}{1 - 2\alpha \cos(k\delta_s) + \alpha^2} \right] \quad (2.6)$$

avec $E_0(\sigma)$ le champ incident. En supposant que α est petit (par exemple $\alpha = 4\%$) ou en négligeant les réflexions multiples, la formule précédente se simplifie en :

$$E(\sigma, \delta_s) \approx E_0(\sigma) [\alpha + (1 - \alpha)^2 e^{ik\delta_s}] \quad (2.7)$$

En sortie du deuxième interféromètre (le démodulateur), en supposant que les bras de l'interféromètre de Michelson sont équilibrés, l'intensité totale enregistrée par un photodétecteur est donc égale à :

$$I(\delta_s, \delta_d) = \int I_s(\sigma, \delta_s) [1 + \cos(k\delta_d)] d\sigma \quad (2.8)$$

avec $I_s(\sigma, \delta_s) = E(\sigma, \delta_s) \times E^*(\sigma, \delta_s)$. En utilisant l'approximation de l'équation (2.7), l'interférogramme peut s'écrire comme une somme de quatre termes :

- une constante qui ne dépend que de l'intensité totale émise par la source et de la différence de marche introduite par l'interféromètre sonde ;

$$I_0(\delta_s) = \int P(\sigma) [A + 2B \cos(k\delta_s)] d\sigma \quad (2.9)$$

- une composante modulée ne dépendant que du démodulateur ;

$$I_1(\delta_s, \delta_d) = \int A P(\sigma) \cos(k\delta_d) d\sigma \quad (2.10)$$

- et deux fonctions symétriques qui proviennent du couplage entre les deux interféromètres.

$$I_+(\delta_s, \delta_d) = \int B P(\sigma) \cos[k(\delta_s + \delta_d)] d\sigma \quad (2.11)$$

$$I_-(\delta_s, \delta_d) = \int B P(\sigma) \cos[k(\delta_s - \delta_d)] d\sigma \quad (2.12)$$

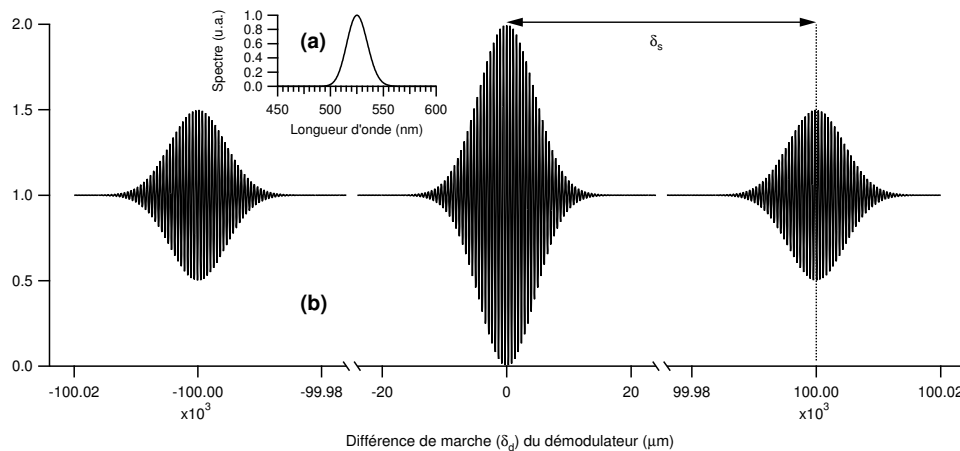


FIG. 2.5 – Interférogramme d'une diode électroluminescente à spectre large à travers deux interféromètres couplés ($A=2B$). La courbe **(a)** représente le spectre de la source. L'interférogramme **(b)** est composé d'un pic central (qui est égale à la partie réelle de la transformée de Fourier du spectre de la source) et de deux pics (symétriques) de remontée de cohérence. La distance entre le maximum du pic central et celui d'un des pics de remontée de cohérence est égale à la différence de marche δ_s introduite par l'interféromètre sonde. Dans ce cas, $\delta_s = 10 \text{ cm}$.

Avec $A = \alpha^2 + (1 - \alpha)^4$ et $B = \alpha(1 - \alpha)^2$. Le résultat est représenté par le graphe **(b)** de la figure 2.5. Nous avons choisi de calculer l'interférogramme d'une diode utilisée dans notre montage expérimental. Son spectre a une forme proche d'une gaussienne centrée sur $\lambda = 525 \text{ nm}$ et une largeur $\Delta\lambda \approx 20 \text{ nm}$ (cf. fig. 2.5 **(a)**). La figure est constituée de trois pics modulés : le pic central semblable à celui vu dans le chapitre précédent et deux autres pics que nous appellerons pics de remontée de cohérence. Leur enveloppe est identique à celle du pic central par contre les franges y sont moins contrastées. Lorsque les deux interféromètres couplés ont leurs deux bras équilibrés, le contraste maximal des franges du pic de remontée de cohérence atteint 50% de celui des franges du pic central. Cette technique d'interférométrie à faible longueur de cohérence dans des interféromètres couplés peut être utilisée pour la métrologie. En particulier, elle permet de localiser précisément une surface par rapport à une autre [36, 37]. En effet, la distance entre le maximum du pic central et celui d'un des pics de remontée de cohérence est égale à la différence de marche δ_s introduite par l'interféromètre sonde. L'intérêt de cette méthode vient du fait que la précision sur la mesure ne

dépend que du rapport signal à bruit [38, 39]. Dans de bonnes conditions (sans aberration chromatique et avec une source intense) il est possible de mesurer de très grandes distances [40] avec une précision limitée seulement par le bruit. Cette technique peut aussi être utilisée pour observer en temps réel, des déplacements [41] ou des déformations de surfaces.

2.4 Application à notre montage

Dans notre montage, la molécule fluorescente à localiser est utilisée à la fois comme source à spectre large et comme sonde. Il est à noter que le montage peut aussi être utilisé de manière plus classique ; en éclairant la lamelle de microscope avec une source à spectre large et en faisant interférer le faisceau transmis et celui réfléchi par cette lamelle nous pouvons la localiser par rapport au foyer commun des objectifs. Nous verrons dans la suite que cette méthode a été utilisée pour prérégler notre montage expérimental. Dans ce paragraphe, nous ne considérerons qu'une molécule unique située sur l'axe optique. De plus, nous supposons que quelle que soit sa position, l'intensité du faisceau excitateur est constante. La figure 2.6 (a), nous montre que lorsque la source s'éloigne du foyer (le long de l'axe optique) une source fictive symétrique par rapport au plan focal apparaît, de sorte qu'à la sortie du 4π -microscope-interféromètre deux faisceaux différents se superposent ; l'un est convergent, l'autre divergent. En fait, la symétrie des deux sources (réelle et fictive) par rapport au plan focal de l'objectif dépend de la position des éléments du montage. Le miroir doit être situé dans le plan focal de la lentille qui sera elle-même placée de façon à ce que son autre foyer soit confondu avec celui de l'objectif. Cet interféromètre (cf. fig. 2.6 (a) et (b)) est donc équivalent à un interféromètre de Linnik (cf. fig. 2.6 (c)) dans lequel les deux miroirs se déplacent symétriquement par rapport aux foyers des lentilles. Supposons que la source émet une onde sphérique et que les objectifs sont identiques, les bras de l'interféromètre sont alors équilibrés. Dans ce cas l'intensité [42] en sortie s'écrit :

$$I_s(z) = \int P(\sigma) [1 + F_{NA}(z)] d\sigma \quad (2.13)$$

avec

$$F_{NA}(z) = \frac{1}{\sin^2(\theta_{max})} \int_0^{\theta_{max}} \cos [2k(2z \cos \theta + L)] \sin(2\theta) d\theta . \quad (2.14)$$

z correspond à la valeur algébrique du déplacement de la source par rapport au foyer commun des objectifs, L est la distance optique de ce foyer au miroir

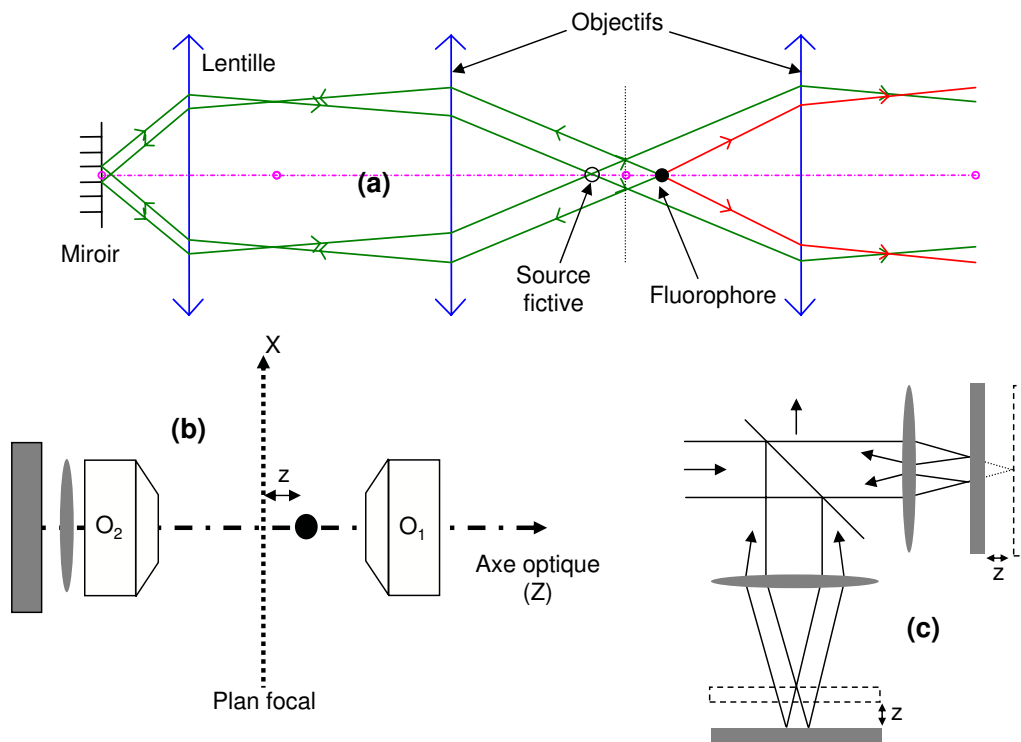


FIG. 2.6 – Les schémas (a) et (b) représentent l'interféromètre sonde de notre montage. Le fluorophore y est utilisé à la fois comme source à spectre large et comme sonde permettant de le localiser axialement par rapport au foyer. Ce 4π -microscope-interféromètre est équivalent à un interféromètre de Linnik (c) dans lequel les deux miroirs se déplacent symétriquement par rapport aux foyers des lentilles.

et θ_{max} est l'angle maximal de collection défini par l'ouverture numérique³ (NA) de l'objectif. Il est à noter que dans un interféromètre de Linnik [30, 43] ou de Mirau [32] où seul un miroir se déplacerait d'une distance z par rapport au foyer de la lentille, la fonction $F_{NA}(z)$ s'écrit :

$$F_{NA}(z) = \frac{1}{\sin^2(\theta_{max})} \int_0^{\theta_{max}} \cos(2kz \cos \theta) \sin(2\theta) d\theta. \quad (2.15)$$

³ $NA = n \sin(\theta_{max})$ avec n l'indice optique du liquide d'immersion.

Après un changement de variables et une intégration par partie, l'équation (2.14) devient :

$$F_{NA}(z) = \frac{4k z (\sin \varphi_1 - \cos \theta \sin \varphi_2) + \cos \varphi_1 - \cos \varphi_2}{8(k z \sin(\theta_{max})^2)} \quad (2.16)$$

$$\text{avec } \begin{cases} \varphi_1 = 2k(2z + L) \\ \varphi_2 = 2k(2z \cos(\theta_{max}) + L) \end{cases} \quad (2.17)$$

Quand la source est au foyer ($z=0$), nous retrouvons la formule classique des interféromètres à deux ondes :

$$F_{NA}(0) = \cos(2kL) \quad (2.18)$$

Dans notre montage représenté à la figure 2.1, nous compensons le retard introduit par le 4π -microscope-interféromètre avec un interféromètre de Michelson. Ses deux bras sont identiques de sorte que l'intensité mesurée par la photodiode s'écrive :

$$I(\delta_d, z) = \int P(\sigma) [1 + F_{NA}(z)] [1 + \cos(k\delta_d)] d\sigma \quad (2.19)$$

Lorsque le fluorophore est au foyer, l'interférogramme est semblable à celui représenté à la figure 2.5. Il est formé d'un pic central qui est la transformée en cosinus du spectre de la source et d'un pic de remontée de cohérence⁴ deux fois moins contrasté qui permet de localiser le fluorophore par rapport au miroir. Dès que la source se déplace le long de l'axe optique, le pic de remontée de cohérence se déplace dans la même direction, le contraste de ses interférences chute et son enveloppe se déforme [27]. Nous appellerons "effets Linnik", ces deux derniers phénomènes (cf. fig. 2.7).

2.5 Localisation d'un luminophore

Finalement dans ce montage, la position du pic de remontée de cohérence par rapport au pic central, nous permet seulement de localiser le fluorophore par rapport au miroir de l'interféromètre sonde. Notre but est de pouvoir le localiser par rapport au foyer commun des objectifs. C'est, en fait, la hauteur du pic et la forme de son enveloppe qui donnent les informations sur sa position par rapport au foyer et sur le sens de son déplacement. En effet,

⁴En fait, il y a un deuxième pic de remonté de cohérence mais puisqu'il est identique et symétrique ($\delta < 0$) au premier nous n'en tiendrons plus compte dans la suite.

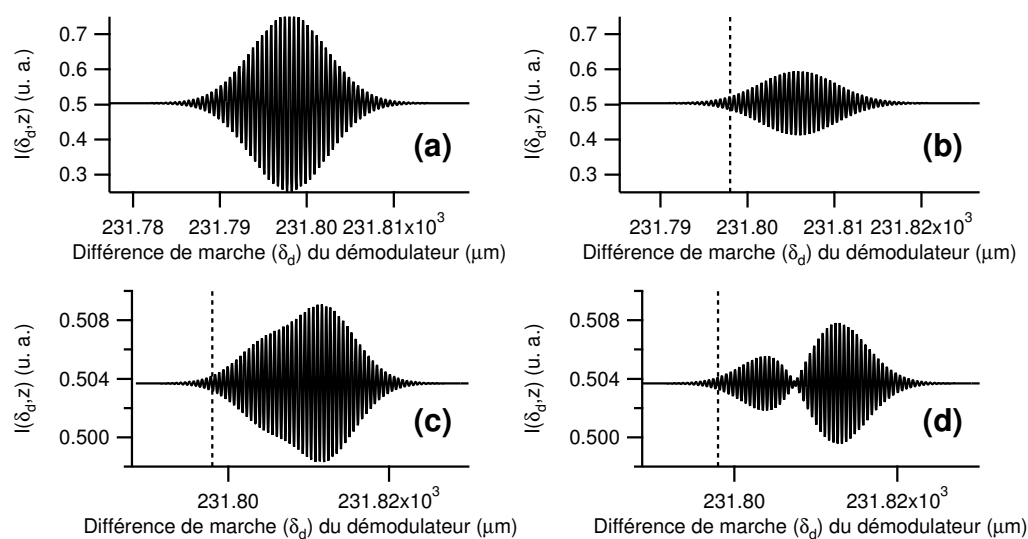


FIG. 2.7 – *Pics de remontée de cohérence pour un fluorophore (à spectre gaussien $\lambda_0 = 525 \text{ nm}$ et $\Delta_\lambda = 20 \text{ nm}$) situé à différentes positions le long de l'axe optique : au foyer (a), à $z = 2 \text{ }\mu\text{m}$ (b), à $z = 2.8 \text{ }\mu\text{m}$ (c) et à $z = 2.85 \text{ }\mu\text{m}$ (d). Plus la source est loin du foyer plus le pic s'éloigne, plus le contraste de ses oscillations est faible et plus son enveloppe se déforme. La droite verticale en pointillés repère la position du foyer. Les intensités ont été normalisées par rapport au maximum du pic central. L'ouverture numérique des objectifs est $NA = 0.3$ dans l'air.*

nous pouvons remarquer sur les figures 2.7 (c) et (d), que le pic s'étire dans la direction opposée au déplacement de la source. Pour localiser un luminophore immobile ou qui se déplace très lentement, nous pouvons donc déplacer un des miroirs de l'interféromètre de démodulation, de façon à enregistrer le pic de remontée de cohérence. Une autre méthode consiste à repérer le maximum du pic ($\delta_d = \delta_s$) puis à suivre le mouvement de la source le long de l'axe optique grâce aux variations de l'intensité $I(\delta_d = \delta_s, z)$ (cf. fig. 2.8). Dans ce cas, il est important de régler l'interféromètre de démodulation pour une source située au départ au foyer des objectifs. Sinon la mesure de l'intensité est difficile à relier à la position de la source. Cette situation est représentée à la figure 2.8 (b). Lorsque le démodulateur est bien réglé, le suivi de la molécule sera d'autant mieux que les franges d'interférences seront bien décrites ; la précision de notre mesure est donc directement liée au rapport signal à bruit du système. Notons que plus l'ouverture numérique des objectifs est grande, plus le signal de fluorescence collecté est important et donc meilleur

est le rapport signal à bruit. Par contre, nous pouvons constater sur la figure 2.8 ((a) et (c)), que pour suivre un fluorophore sur une grande distance autour du foyer, il est préférable d'avoir une faible ouverture numérique. Il est donc nécessaire de trouver un compromis entre la qualité du rapport signal à bruit et la distance sur laquelle nous voulons suivre les molécules. Dans le paragraphe suivant, nous allons voir qu'il est possible d'envisager de suivre la molécule sur une grande distance avec des objectifs à fortes ouvertures numériques en utilisant un interféromètre de Linnik comme démodulateur.

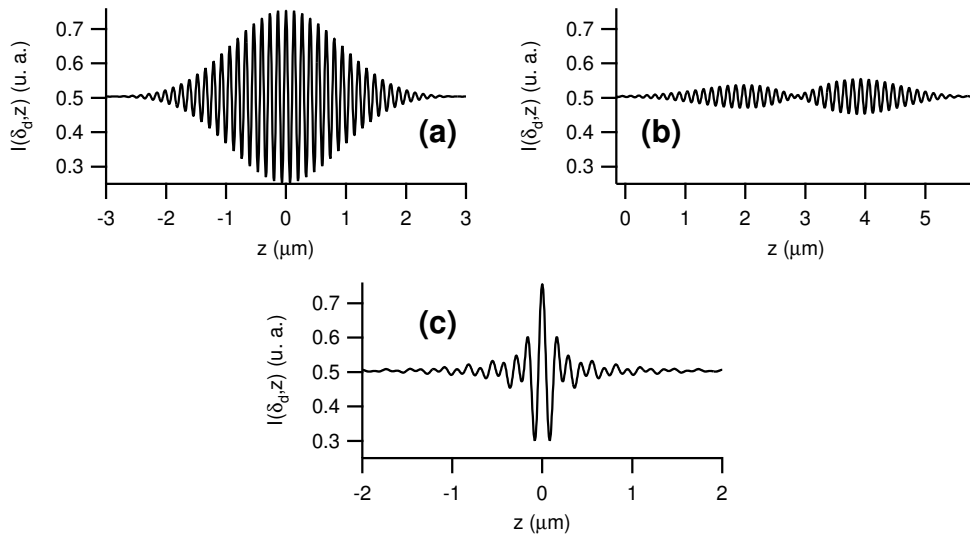


FIG. 2.8 – Intensité $I(\delta_d, z)$ en fonction du déplacement de la source (z) par rapport au foyer. Le démodulateur est réglé (δ_d constant) sur le maximum du pic de remontée de cohérence. La source est située au foyer (a) et (c) ou à $2.85 \mu\text{m}$ du foyer (b). L'ouverture numérique des objectifs est $NA = 0.3$ dans l'air pour (a) et (b) et $NA = 0.9$ dans l'air pour (c).

2.6 Démodulation par un interféromètre de Linnik

L'interféromètre de Linnik utilisé comme démodulateur est utile pour deux raisons. Il sert d'abord à compenser le retard introduit par le 4π -microscope sur l'un des faisceaux (par rapport à l'autre) ; il permet aussi de corriger la divergence (ou la convergence) de chacun des faisceaux qui

interfèrent à la sortie du système. En effet, comme nous pouvons le voir sur la figure 2.9, le système peut se régler en deux étapes. Un premier réglage "grossier" est obtenu en déplaçant le système objectif-miroir sur l'un des bras, il sert à compenser la distance L qu'il y a entre le foyer commun des objectifs et le miroir. Ensuite, un réglage plus "fin" des deux miroirs de l'interféromètre de Linnik permet de corriger la divergence des deux faisceaux. Cette divergence vient de l'écart z qu'il y a entre le foyer et la source. Pour compenser cet écart, il faut donc décaler les miroirs d'une distance $z/2$ dans des directions opposées comme représenté sur la figure 2.9. Remarquons qu'il peut être pratique d'utiliser des objectifs identiques dans le 4π -microscope et dans l'interféromètre de Linnik. Le résultat est un pic de remontée de cohérence d'enveloppe symétrique et de contraste maximal (50% du pic central) quelle que soit la position du luminophore. La mesure de la position de la source par rapport au foyer (z) est alors déterminée par le mouvement des translations piézoélectriques qui positionnent les miroirs.

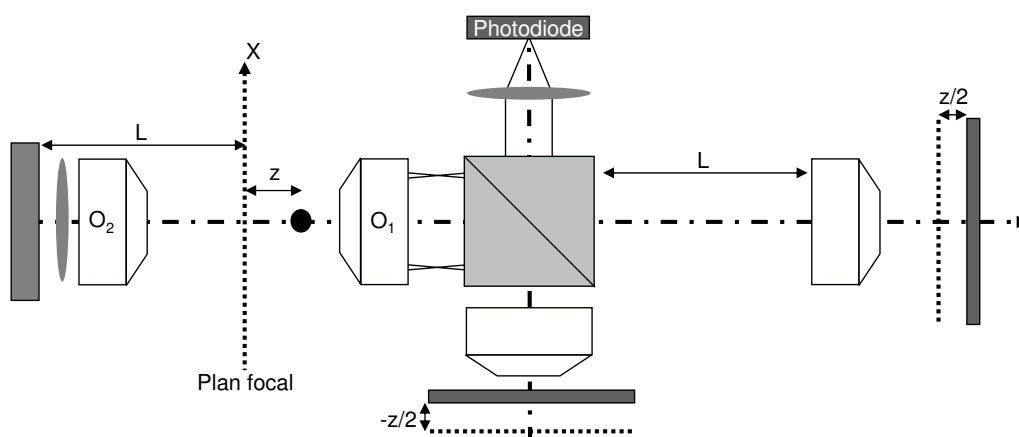


FIG. 2.9 – 4π -microscope couplé à un interféromètre de Linnik.

Conclusion

Notre montage a donc plusieurs avantages. Il conserve ceux des 4π -microscopes classiques comme la collection de la fluorescence dans quasiment toutes les directions ou la super-résolution le long de l'axe optique. Mais l'avantage le plus intéressant est qu'il tire partie des caractéristiques des marqueurs luminescents et notamment de leur spectre. Il permet, par exemple, par simple transformée de Fourier de connaître le spectre de la

source observée, ce qui peut être utile pour travailler avec plusieurs types de luminophores. De plus, la précision sur la localisation d'une source ne dépend que du rapport signal à bruit donc que de la source elle-même⁵. C'est à dire que plus la source est intense, plus précise est la mesure⁶. Cela signifie aussi que notre technique est particulièrement avantageuse pour travailler avec des molécules chimicoluminescentes ou bioluminescentes. En effet, rares sont les méthodes qui n'utilisent pas les caractéristiques du faisceau excitateur pour localiser les objets observés. Finalement, dans notre montage, le fait que la molécule soit excitée optiquement ou chimiquement n'a pas de répercussion sur la précision de la mesure ; l'important est que la molécule soit très lumineuse. Il faut néanmoins répéter que ce montage ne permet de mesurer que le déplacement axial d'une source. Sa localisation transversalement à l'axe optique nécessitera de coupler ce 4π -microscope à un système de suivi de molécule unique (SPT⁷) fonctionnant par exemple avec une caméra ultrasensible. Nous verrons dans le chapitre suivant, ce que devient le pic de remontée de cohérence lorsque la molécule se déplace latéralement.

⁵Nous considérons bien sûr que le matériel est optimisé pour introduire le moins de bruit possible.

⁶De nouveaux marqueurs très lumineux comme les nanocristaux permettront donc d'améliorer les résultats.

⁷De l'expression anglaise "Single Particle Tracking".

Chapitre 3

Le montage expérimental

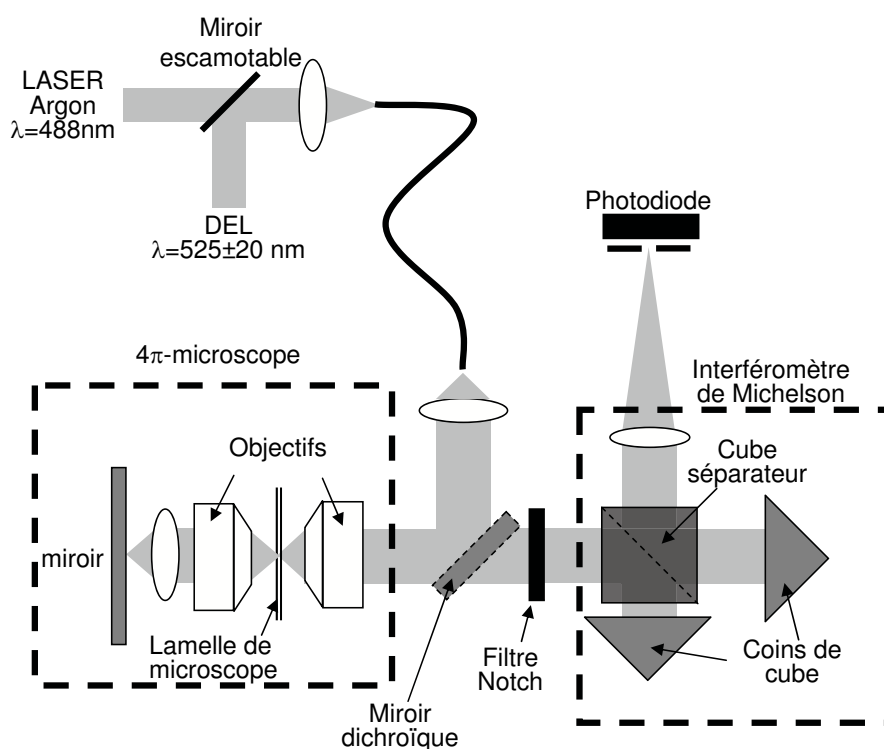
Sommaire

3.1	Réglages et difficultés	33
3.2	Résultats préliminaires	35
3.3	Les échantillons	36
3.4	Résultats sur la fluorescence	39
3.5	Dispersion chromatique	41
3.6	Solutions et perspectives	44
3.7	Déplacement latéral de la source	45

3.1 Réglages et difficultés

Ce montage optique plutôt complexe se règle en plusieurs étapes. Dans un premier temps, il est nécessaire d'aligner parfaitement tous les instruments optiques sur les axes de propagation des faisceaux. Un Laser Argon est couplé dans une fibre monomode car l'extrémité de celle-ci peut être déplacée dans les trois directions de l'espace. De plus, la taille de la source nous permet d'avoir un faisceau exciteur très peu divergent, ce qui facilite nettement les réglages. La lamelle de microscope sur laquelle est déposée une couche de luminophores est orientée perpendiculairement à l'axe optique. L'objectif¹ de microscope de droite sur la figure 3.1 doit ensuite être positionné de façon à focaliser le faisceau laser sur l'échantillon. Puis grâce à un système de moteur

¹Tous les résultats expérimentaux qui suivent, ont été obtenus avec deux objectifs *Zeiss* (Plan Neofluar) d'ouverture numérique NA=0.3 dans l'air.

FIG. 3.1 – *Le montage expérimental.*

pas-à-pas très précis², nous venons placer le deuxième objectif pour former un système afocal. Enfin, nous pouvons aligner le système de réflexion, en prenant garde à ce que les deux faisceaux focalisés soient parfaitement superposés. Le réglage de ce bloc³ est non seulement délicat mais crucial. En effet, la précision de cet alignement a des répercussions sur le rapport signal à bruit de la mesure. Il est à remarquer que nous utilisons un miroir placé au foyer d'une lentille pour réfléchir le Laser et une partie de la fluorescence. Ce système sert à retourner spatialement l'image faite par l'objectif de gauche (sur la figure 3.1) pour qu'elle se superpose à celle faite par l'objectif de droite, au niveau du détecteur. En effet, si l'échantillon est constitué de plusieurs fluorophores, il est spatialement incohérent. Dans ce cas, sans la lentille, seule la fluorescence émise par une source placée sur l'axe optique peut interférer à la sortie de l'interféromètre de démodulation. L'interféromètre de Michelson a été réglé au préalable en teinte plate. Pour des raisons de commodité, nous

²Nous utilisons des moteurs M-110/111 de PI qui permettent de contrôler les déplacements avec une résolution de moins de 25 nm.

³Le bloc est appelé sur la figure 3.1 "4π-microscope".

utilisons un cube séparateur⁴ et des "coins de cubes". Bien que ces "coins de cubes" fonctionnent en réflexion totale, il est à noter qu'ils doivent être métallisés si les faisceaux sont polarisés. Sinon le faisceau ressort polarisé différemment dans les six zones délimitées par les arrêtes. En effet, l'ordre des trois réflexions internes détermine la polarisation de sortie [44].

Dans un deuxième temps, nous remplaçons le Laser par une diode électroluminescente qui a un spectre comparable à celui d'un fluorophore comme "l'Oregon Green". Le faisceau de la diode est aligné sur celui du Laser puisque nous l'injectons, à l'aide d'un miroir escamotable, dans la même fibre optique (cf. fig. 3.1). En faisant interférer (à la sortie du démodulateur) le faisceau réfléchi par la lamelle de microscope et celui transmis par cette lamelle puis réfléchi par le miroir, nous localisons le pic de remontée de cohérence. La diode facilite les réglages puisque le faisceau est intense, stable et qu'il n'y a pas de problème lié à l'épaisseur de l'échantillon. Il est important d'avoir une idée précise sur la position de ce pic de remontée de cohérence. En effet, la durée de vie des luminophores ne nous permet pas de balayer des plages trop longues pour le chercher. Avec la diode, nous pouvons déplacer le miroir de l'interféromètre de Michelson aussi lentement que possible (pour améliorer le rapport signal à bruit) sur des durées très longues.

Une fois que le pic de remontée de cohérence est localisé, nous pouvons rallumer le Laser pour exciter les fluorophores de l'échantillon (et éteindre la diode). Nous utilisons un filtre holographique "Notch⁵" pour arrêter complètement la lumière venant du Laser. La position et la forme du pic nous renseignent alors sur la localisation axiale du luminophore observé avec une précision ne dépendant que du rapport signal à bruit. Notons qu'il est important que le spectre de la diode et celui des fluorophores utilisés soient proches car la dispersion chromatique du montage peut décaler le pic à une grande distance.

3.2 Résultats préliminaires

Pour régler notre système nous avons donc utilisé une diode électroluminescente (DEL) qui a un spectre proche de celui des fluorophores observés dans la suite. Les résultats expérimentaux [45] de la figure 3.2 nous per-

⁴Ce cube remplace la séparatrice et la compensatrice des interféromètres de Michelson classiques. L'expérimentateur n'a donc plus besoin de faire le parallélisme entre ces deux lames.

⁵Ce filtre vendu par Kaiser Optical Systems est un coupe-bande très étroit.

mettent d'une part de connaître le spectre de la source utilisée par simple transformée de Fourier du pic central et d'autre part de déterminer la position de la surface semi-réfléchissante de la lamelle par rapport au miroir. La distance qui les sépare, est dans ce cas estimée à 9.16204 cm. Sur la figure 3.3 (a), nous comparons le pic de remontée de cohérence obtenu expérimentalement à celui prévu par le calcul. La largeur du pic expérimental est "anormalement" élevée (près de dix fois celle prévue théoriquement) et sa hauteur plutôt faible ; pourtant les transformées de Fourier de ces deux pics sont comparables (Cf. fig. 3.3 (b)). Le problème semble venir de la dispersion chromatique d'une partie du montage. Nous expliquerons ce phénomène dans un prochain paragraphe.

3.3 Les échantillons

Sur la figure 3.4, la courbe (b) nous montre que les pics de remontée de cohérence de deux sources incohérentes situées à une distance de $\lambda_0/8$ l'une de l'autre le long de l'axe optique⁶, sont décalés d'une demie frange. Comme ces sources sont incohérentes, l'intensité détectée par la photodiode est la somme des intensités provenant de chacune des sources. Il en résulte donc, un brouillage qui atténue le contraste des franges dans le pic mesuré par le photodétecteur. Sur la courbe 3.4 (a), le maximum du pic atteint à peine 3% de celui d'un pic obtenu avec une seule source. Il est donc nécessaire de travailler avec des échantillons les plus fins possible. Néanmoins la courbe 3.4 (c) montre que l'effet de brouillage est moins important avec une couche continue et homogène de luminophores. En effet, pour atteindre le même résultat (sur la hauteur du pic) qu'à la courbe (a), nous avons quasiment doublé l'épaisseur de l'échantillon. Ce résultat s'explique par le fait que chaque fluorophore de l'échantillon doit être situé (axialement) à une distance de $\lambda_0/8$ d'un autre fluorophore pour qu'il y ait un brouillage des franges dans le pic. Remarquons que Schrader et al. ont aussi besoin de travailler avec des couches très fines de luminophores [46] pour étudier la résolution axiale de leurs microscopes notamment celle de leur 4π -microscope de type C (Cf. Chapitre 5.2.2). En effet, pour atténuer les lobes secondaires du volume d'efficacité de détection (Cf. Chapitre 5.1.2) de leur 4π -microscope, ils font interférer les deux faisceaux de fluorescence émis de part et d'autre de l'échantillon.

Nous avons testé de nombreux échantillons : des mélanges de luminophores (Rhodamine 6G ou nanocristaux) et de polymères (PMMA⁷) ont été

⁶ λ_0 est la longueur d'onde centrale du spectre des sources.

⁷Poly-méthyl-metacrylate.

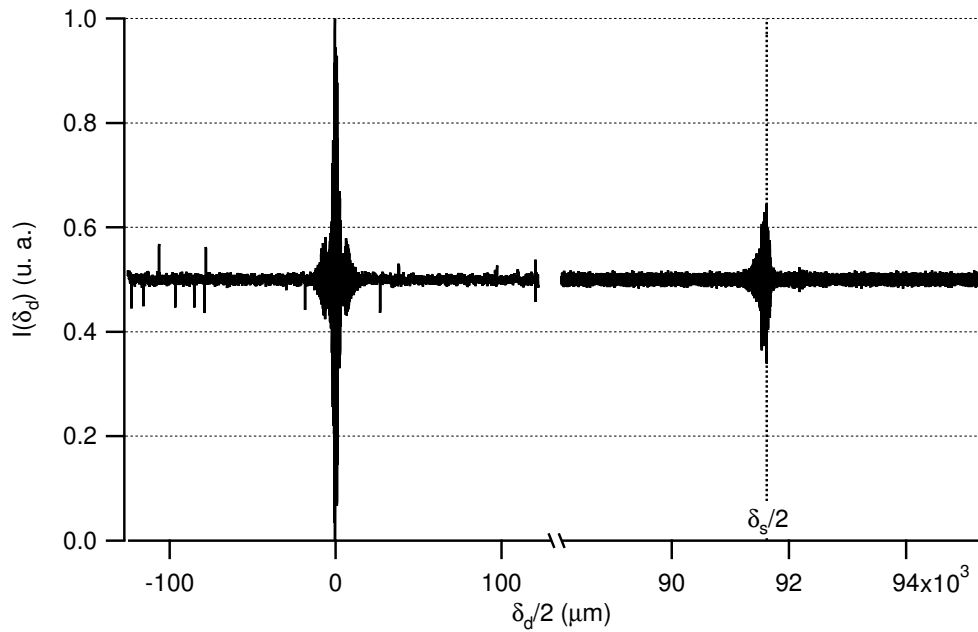


FIG. 3.2 – Le pic central est la partie réelle de la transformée de Fourier du spectre de la DEL, il est centré sur $\delta_d = 0$. A droite, le pic de remontée de cohérence (plus petit) permet de positionner la surface de la lamelle de microscope par rapport au miroir.

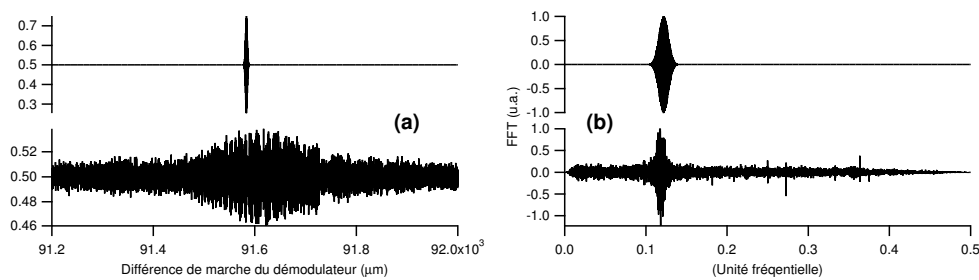


FIG. 3.3 – Les courbes (a) représentent le pic de remontée de cohérence obtenu expérimentalement avec la DEL (en bas) et celui prévu par le calcul (en haut). Les courbes (b) correspondent respectivement aux transformées de Fourier (FFT) des courbes (a).

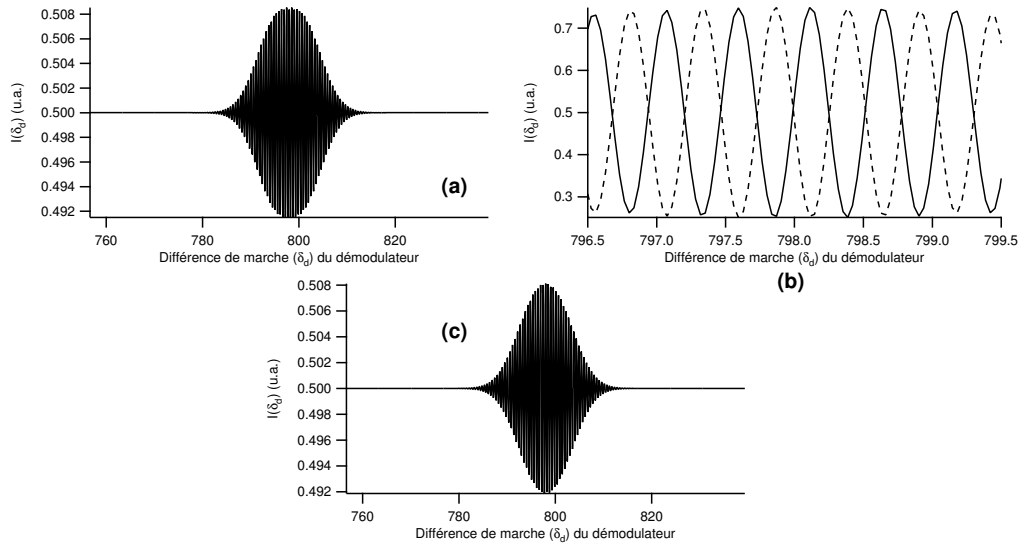


FIG. 3.4 – La courbe (a) représente le pic de remontée de cohérence lorsque deux luminophores sont situés respectivement à $z = \lambda_0/16$ et $z = -\lambda_0/16$, avec $\lambda_0 = 525$ nm et $\Delta_\lambda = 20$ nm qui sont les caractéristiques du spectre des sources. La courbe (b) montre que les deux pics sont décalés d'une demi période l'un par rapport à l'autre, le brouillage qui en résulte explique pourquoi l'amplitude des oscillations du pic (a) est si faible. La courbe (c) représente le pic de remontée de cohérence résultant d'un amas de luminophores de 100 nm le long de l'axe optique.

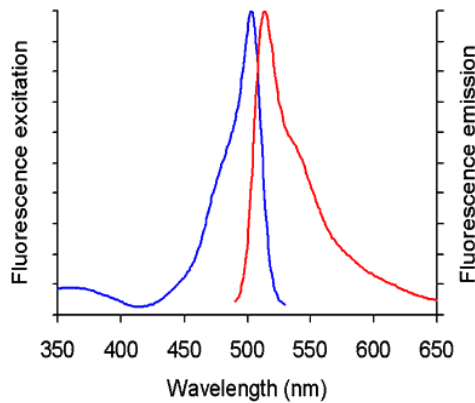


FIG. 3.5 – Spectres d'excitation (à gauche) et d'émission (à droite) de Fluospheres[®] de 20 nm de diamètre de carboxylate modifié.

déposés en faisant tourner l'échantillon très rapidement ($\approx 4000 \text{ tr} \cdot \text{mn}^{-1}$); mais la méthode la plus efficace a été de "coller" des nanobilles⁸ de carboxylate de 20 nanomètres de diamètre sur la lamelle à l'aide de poly-L-lysine⁹. Les spectres d'excitation et d'émission de ces billes représentés à la figure 3.5, sont donnés par Molecular Probes. Nous estimons que les échantillons ainsi faits, sont constitués d'une monocouche de billes.

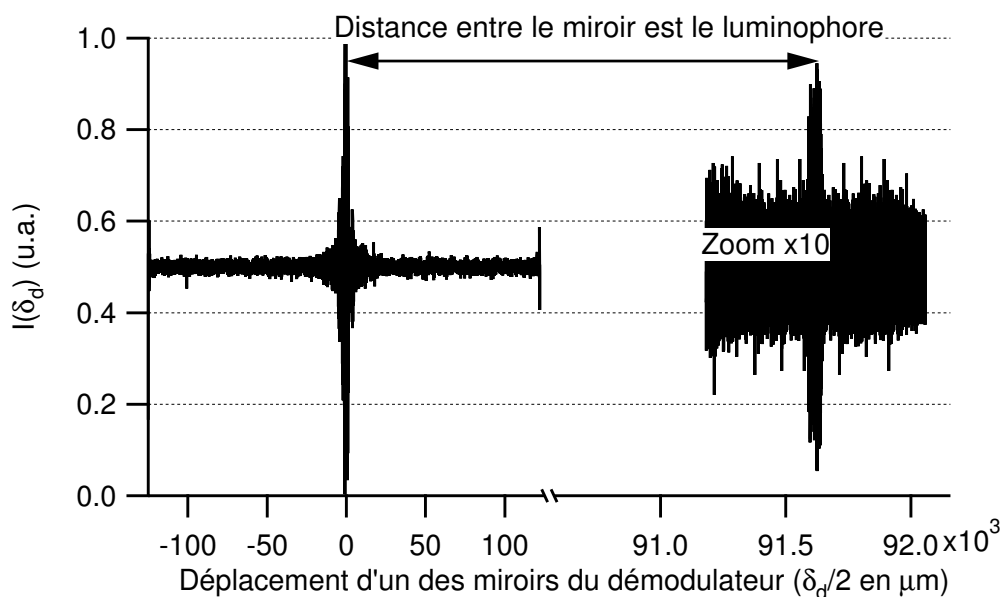


FIG. 3.6 – Le pic central est la partie réelle de la transformée de Fourier du spectre d'émission des billes fluorescentes, il est centré sur $\delta_d = 0$. A droite, le pic de remontée de cohérence a été zoomé 10 fois, il permet de positionner la monocouche de billes par rapport au miroir.

3.4 Résultats sur la fluorescence

L'échantillon de nanobilles fixées sur la lamelle par la poly-L-lysine, nous a permis d'obtenir un pic de remontée de cohérence [45]. Le rapport signal à bruit est faible; cependant avec un filtre fréquentiel adapté, nous avons réussi à l'extraire du bruit. Le pic de la figure 3.6 est situé à la même position que celui de la figure 3.2 obtenu avec la diode électroluminescente.

⁸Ces billes sont des Fluospheres® vendue par MOLECULAR PROBES.

⁹La poly-L-lysine sert habituellement à fixer les cellules sur les lames de microscope.

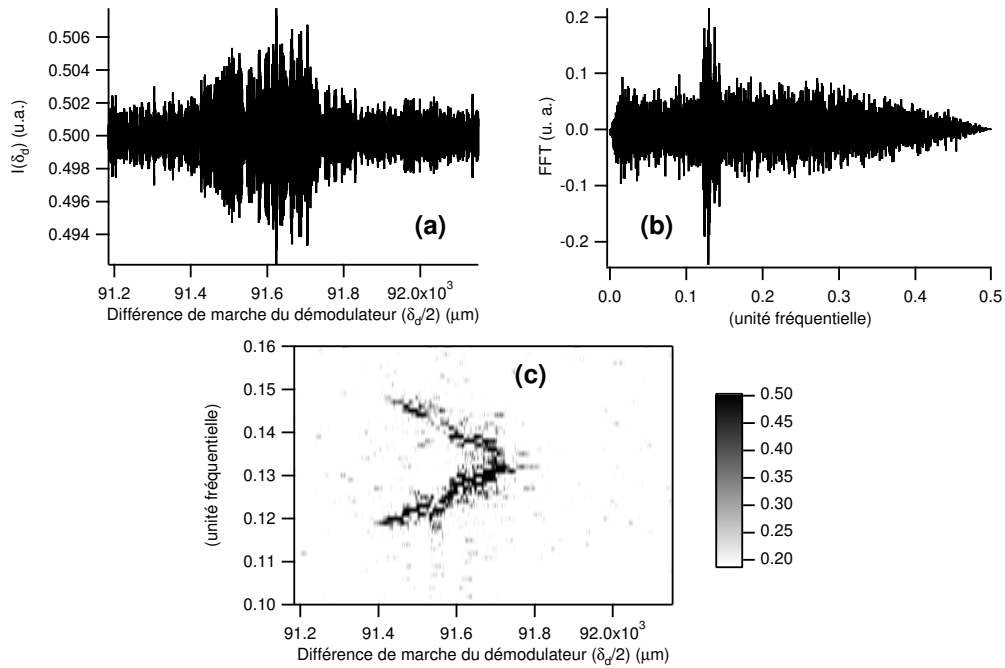


FIG. 3.7 – La courbe (a) représente un pic de remontée de cohérence obtenu avec une monocouche de nanobilles. La transformée de Fourier (FFT) de ce pic a été calculée en (b) et (c). La courbe (c) est en fait un spectrogramme du pic.

Nous attendions ce résultat puisque les deux sources ont pratiquement les mêmes caractéristiques spectrales. Le pic est représenté en gros plan sur la figure 3.7 (a). Nous pouvons constater que ce pic est plus large que prévu, comme celui obtenu avec la DEL. Une transformée de Fourier (FFT) nous permet de vérifier que nous sommes bien en train d'observer des interférences sur la fluorescence (Cf. figure 3.7 (b)). Bien que nous travaillions avec des lentilles et des objectifs achromatiques, nous soupçonnons que l'élargissement des pics est le résultat de dispersion chromatique. La figure 3.7 (c) est un spectrogramme du pic, elle représente les fréquences présentes dans le signal en fonction de la différence de marche du démodulateur. Pour calculer ce spectrogramme nous avons simplement découpé le pic en morceaux¹⁰ de 35 microns et calculé leur transformée de Fourier (FFT). Nous y voyons clairement une dispersion des fréquences à l'intérieur du pic. Le début du pic

¹⁰Chaque morceau recouvre une partie de ces voisins pour qu'il n'y ait pas d'effet de bord.

est constitué des hautes et basses fréquences du spectre de la source tandis que les fréquences centrales se retrouvent en fin de pic. Dans le paragraphe suivant, nous allons expliquer ce phénomène.

3.5 Dispersion chromatique en interférométrie à faible longueur de cohérence

Jusqu'ici nous avons supposé que les différences de marches introduites par l'interféromètre sonde et le démodulateur ne dépendaient pas de la longueur d'onde de la source. Nous pouvons considérer que cette hypothèse reste vraie pour l'interféromètre de Michelson utilisé comme démodulateur mais il semblerait qu'elle soit fautive pour notre 4π -microscope. Les objectifs¹¹ ou la lentille achromatique sont probablement mal corrigés des aberrations chromatiques. A priori le problème viendrait des objectifs, en effet, les objectifs Zeiss ou Leica (contrairement aux objectifs Olympus ou Nikon) utilisés seuls, ne seraient pas corrigés contre les aberrations¹². Le problème pourrait aussi venir de la lamelle de microscope, cependant nous avons pris garde de travailler de façon à ce que chaque faisceau ne traverse qu'une fois la lamelle. Rappelons que le pic de remontée de cohérence est décrit par la fonction de l'équation (2.12) :

$$I(\delta_s, \delta_d) \propto \int P(\sigma) \cos [2\pi\sigma (\delta_s - \delta_d)] d\sigma \quad (3.1)$$

En posant

$$\phi(\sigma) = 2\pi\sigma [\delta_s(\sigma) - \delta_d], \quad (3.2)$$

le développement limité de ϕ en σ au voisinage de σ_0 s'écrit :

$$\phi(\sigma) = \phi(\sigma_0) + (\sigma - \sigma_0) \left(\frac{\partial\phi}{\partial\sigma} \right)_{\sigma_0} + (\sigma - \sigma_0)^2 \left(\frac{\partial^2\phi}{\partial\sigma^2} \right)_{\sigma_0} + \dots \quad (3.3)$$

H. Giovannini et al. ont montré [37, 47, 48] que le terme du premier ordre a tendance à décaler le pic de remontée de cohérence par rapport au pic central. Ceci peut poser des problèmes pour connaître la position de notre source mais n'est pas gênant pour détecter et observer le pic. Par contre le terme du deuxième ordre (comme ceux d'ordre supérieur) modifie l'enveloppe

¹¹Nous avons utilisé des objectifs Plan-Neofluar® de Zeiss, d'ouverture numérique NA=0.3 dans l'air.

¹²Nous ne prétendons pas que les microscopes Zeiss et Leica ne sont pas aussi bien corrigés contre les aberrations que leurs concurrents. En fait, il semble qu'ils utilisent la lentille de tube pour corriger l'ensemble du système.

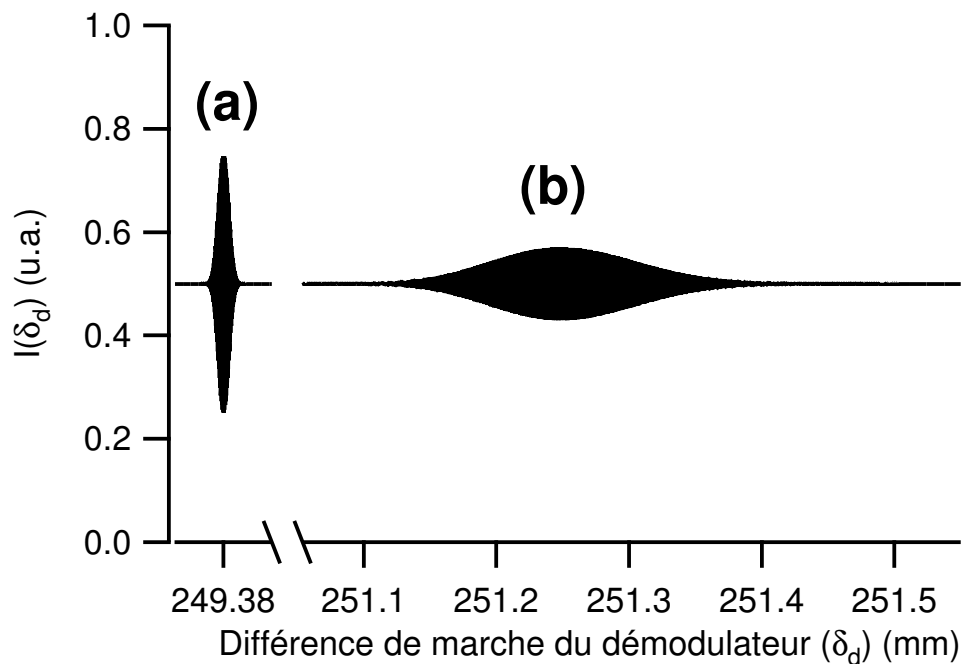


FIG. 3.8 – *Effet de la dispersion chromatique sur le pic de remontée de cohérence. La source est à spectre gaussien ($\lambda_0 = 525$ nm et $\Delta_\lambda = 20$ nm). La courbe (a) représente le pic de remontée de cohérence obtenu sans tenir compte des effets dispersifs d'une lame de silice de 2 cm d'épaisseur. La courbe (b) représente le pic de remontée de cohérence obtenu en tenant compte des effets dispersifs d'une lame de silice de 2 cm d'épaisseur.*

du pic. L'élargissement des pics mesurés avec la DEL ou avec les nanobilles fluorescentes en est une des conséquences. Pour simuler ce phénomène nous avons placé une lame de verre de 2 centimètres d'épaisseur entre la lentille et l'objectif du 4π -microscope. La courbe (b) de la figure 3.8 représente le pic de remontée de cohérence obtenu en tenant compte des effets dispersifs de la silice décrits par I. H. Malitson dans [49]. Par contre la courbe (a) représente le pic de remontée de cohérence obtenu sans tenir compte des effets dispersifs. Sur cette figure 3.8, nous pouvons nettement voir le double effet de la dispersion chromatique sur le pic de remontée de cohérence : un décalage de 1.875 millimètres et une déformation de l'enveloppe. Comme dans notre montage, le pic subi un élargissement d'un facteur 10 et le contraste de la modulation est nettement plus faible que prévu (sans dispersion). Dans notre montage (où il n'y a pas de lame de verre), la dispersion chromatique semble venir des lentilles. Nous allons donc reprendre les calculs précédents

en tenant compte des aberrations chromatiques des optiques. Nous avons vu que

$$\delta_s = 2 * (L_0 + f_l + f_o) \quad (3.4)$$

quand la source est au foyer. Supposons que L_0 , la distance entre la lentille et l'objectif, ne dépend pas de la longueur d'onde puisque le milieu est de l'air. Compte tenu de la relativement faible largeur spectrale des sources, nous faisons l'hypothèse que la somme des focales de l'objectif (f_o) et de la lentille (f_l) est linéaire en fonction de σ :

$$f_l + f_o = F(\sigma_0) + \alpha(\sigma - \sigma_0). \quad (3.5)$$

Avec $\sigma_0 = 1/0.525 \mu\text{m}^{-1}$ et $\alpha = 600 \mu\text{m}^2$ nous obtenons un pic (cf. figure 3.9) qui a une enveloppe proche des pics expérimentaux vus précédemment. Cette valeur de α correspond à un écart de la distance focale de $87 \mu\text{m}$ sur les 40 nm de la largeur spectrale de la source. Rappelons que la somme des deux focales est supérieure à 3 cm . Il est donc impératif que la lentille et l'objectif de microscope soient très bien corrigés des aberrations chromatiques.

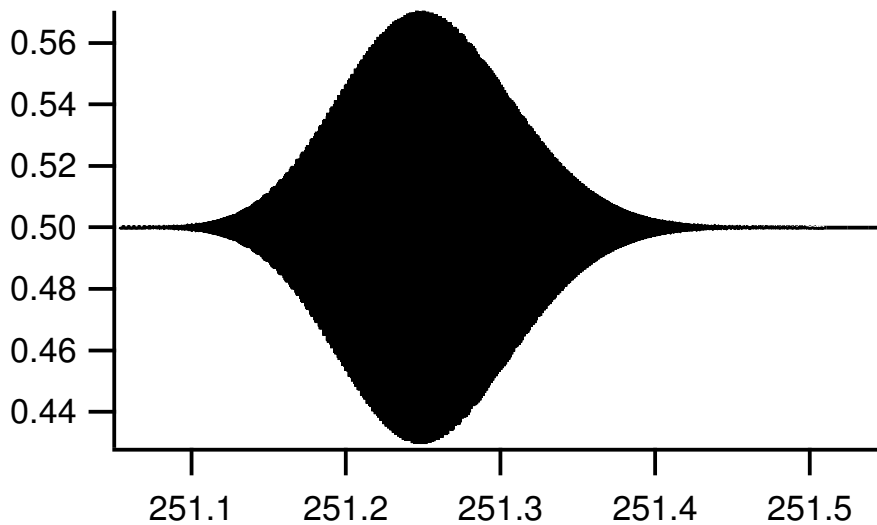


FIG. 3.9 – *Effet des aberrations chromatique sur le pic de remontée de cohérence. Nous avons considéré un écart de la distance focale de $87 \mu\text{m}$ sur la largeur spectrale de la source ($\alpha = 600 \mu\text{m}^2$ dans l'équation (3.5)). La source est à spectre gaussien ($\lambda_0 = 525 \text{ nm}$ et $\Delta_\lambda = 20 \text{ nm}$). Cette courbe est à comparer à celles de la figure 3.8.*

3.6 Solutions et perspectives

Pour améliorer notre montage, il semble indispensable que le système objectif-lentille-miroir du 4π -microscope soit parfaitement achromatique. La solution la plus simple est d'utiliser du matériel très bien corrigé des aberrations. Cependant à l'instar de Zeiss ou Leica, nous pouvons aussi construire le système de telle façon que la lentille corrige les aberrations de l'objectif. Nous évoquerons une dernière solution qui consiste à compenser la dispersion chromatique du 4π -microscope avec le démodulateur. L'idée est de rajouter sur l'un des bras de l'interféromètre de Michelson le système représenté à la figure 3.10. Un objectif et une lentille identiques à ceux du 4π -microscope forment un système afocal. Cette méthode permet d'obtenir des pics de re-

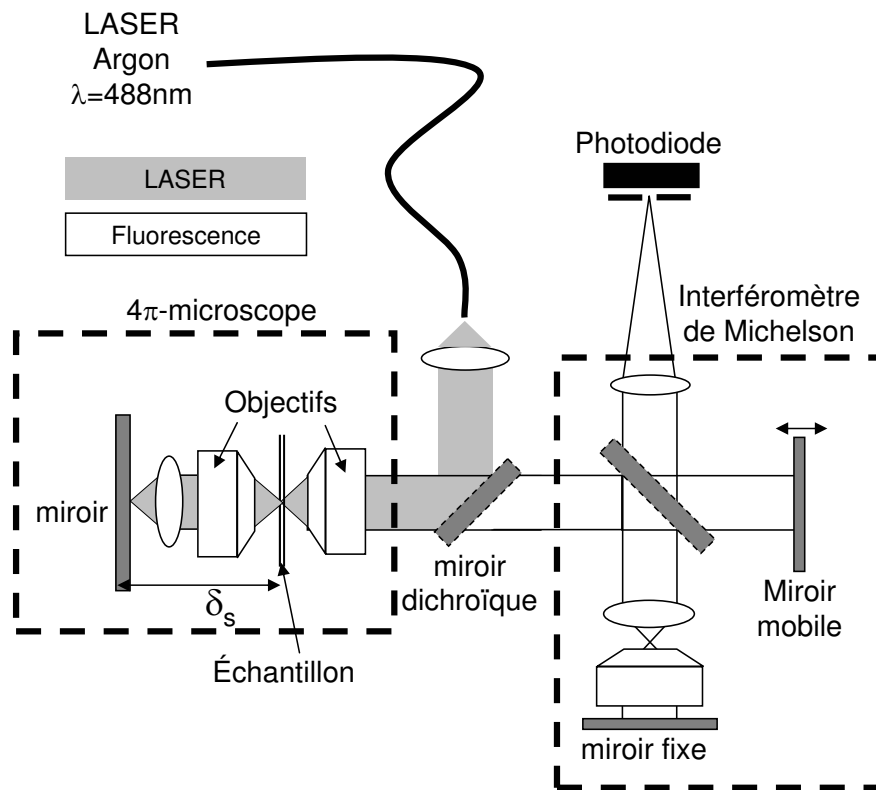


FIG. 3.10 – Le système afocal formé d'un objectif et d'une lentille identiques à ceux du 4π -microscope et placé sur le bras fixe de l'interféromètre de démodulation, permet de compenser la dispersion chromatique introduite par le 4π -microscope.

montée de cohérence non-déformés. Malheureusement, le fait d'avoir modifié le démodulateur a déplacé le problème sur le pic central. Cependant il ne faut pas dramatiser car un interféromètre de Michelson est nettement plus simple à régler qu'un 4π -microscope. En utilisant donc cette méthode associée à l'une des deux premières, le montage doit pouvoir donner de meilleurs résultats.

3.7 Déplacement latéral de la source

Jusqu'à présent, nous n'avons considéré que des sources se déplaçant le long de l'axe optique. Dans ce paragraphe nous allons nous intéresser aux effets du déplacement transverse à l'axe optique d'une source. Pour cela nous avons dû faire l'étude vectorielle du processus d'imagerie d'un fluorophore à

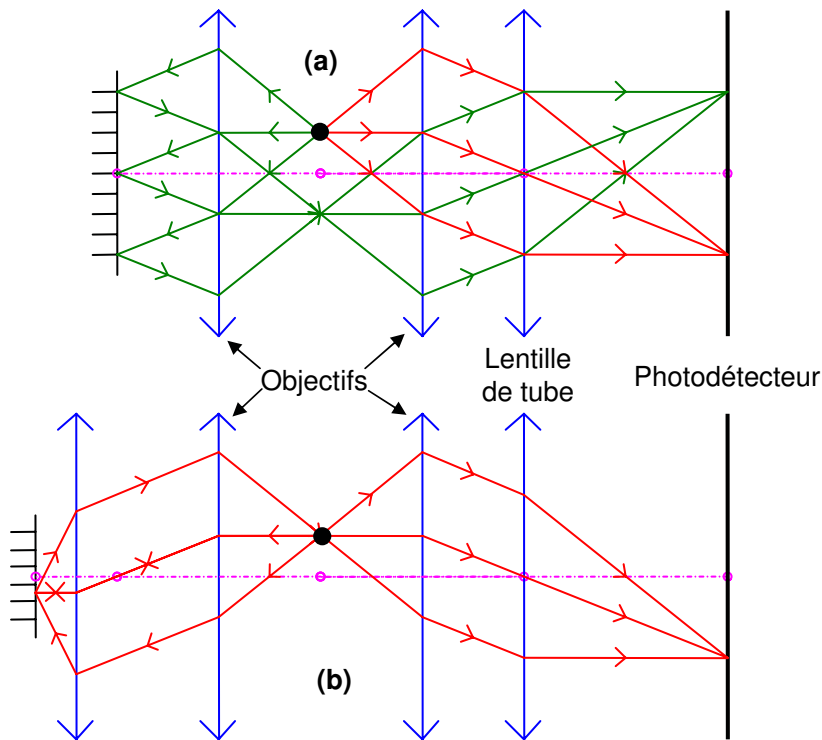


FIG. 3.11 – La présence d'une lentille située entre le miroir et l'objectif du 4π -microscope permet de superposer les deux faisceaux de fluorescence (Cf. fig. (b)). Par contre, sans lentille (Cf. fig. (a)), le montage forme deux images symétriques par rapport au foyer de la lentille de tube pour chaque source.

travers un microscope simplifié¹³. Tous ces calculs sont développés dans le paragraphe 4.3.2. Néanmoins en nous limitant au cas d'une source dans le plan focal, un calcul simple peut nous permettre de prévoir la forme du pic de remontée de cohérence. La figure 3.11 nous rappelle que l'image d'un fluorophore décentré à travers notre montage est formée d'une ou deux taches selon qu'il y ait ou pas une lentille entre le miroir et l'objectif du 4π -microscope. Dans le cas sans lentille, le contraste des franges d'interférences du pic de remontée de cohérence dépend essentiellement de la surface de recouvrement des deux taches. La hauteur du pic diminue donc rapidement au cours du déplacement latéral de la source. Pour des échantillons constitués d'une couche de luminophores comme ceux que nous avons utilisés dans les expériences décrites précédemment, seules les molécules très proches du foyer participent à la formation du pic de remontée de cohérence. Les autres ne font qu'augmenter la valeur moyenne du signal. Par contre, dans notre montage (avec la lentille) chaque source a ses deux images superposées. Ainsi lors d'un déplacement latéral d'un fluorophore, le contraste ne varie pas, seule la valeur moyenne du signal chute en suivant la loi d'efficacité de collection¹⁴ du microscope. Nous verrons dans le chapitre 4, une méthode permettant de calculer les champs d'excitation et d'émission diffractés à travers le microscope.

¹³Pour nous un microscope est formé d'un objectif et d'une lentille de tube.

¹⁴Les volumes d'efficacité de collection et de détection seront décrits dans la partie suivante.

Troisième partie

*Calculs de diffraction dans un
microscope*

*Application au calcul de la
résolution en microscopie
confocale à fluorescence*

Introduction

Dans le paragraphe 3.7 du chapitre 3, nous avons vu qu'une modélisation simple ne suffisait plus pour prévoir la forme du pic de remontée de cohérence dans le cas où les luminophores se déplacent hors de l'axe optique. Dans le chapitre 4, nous avons donc décidé d'étudier le problème de la diffraction dans un microscope à fluorescence. Pour cela, nous avons utilisé et développé une méthode géométrique de calcul vectoriel de la diffraction. Dans un premier temps, nous nous sommes intéressés à l'excitation dans le microscope. Nous avons donc calculé le champ (et l'intensité), au voisinage du foyer d'un objectif à forte ouverture numérique, provenant de la focalisation (par cet objectif) d'un Laser polarisé. Les cartes d'intensité en trois dimensions ainsi obtenues, nous ont permis de définir les volumes d'efficacité d'excitation des luminophores en fonction de plusieurs paramètres (Ouverture numérique de l'objectif, polarisation et forme du faisceau...). Ensuite nous avons résolu rigoureusement le problème de l'imagerie d'un fluorophore par un microscope simple¹⁵. Tous ces calculs nous ont permis d'étudier, dans le chapitre 5, la résolution, dans toutes les directions de l'espace, de plusieurs types de microscopes confocaux à fluorescence notamment de 4π -microscopes. Pour terminer ce chapitre, nous proposons un nouveau type de 4π -microscope qui a, en particulier, l'avantage d'atteindre une résolution latérale meilleure que la limite de diffraction.

¹⁵Un objectif à forte ouverture numérique et une lentille dite de Telan forment un système confocal appelé microscope.

Chapitre 4

Modélisation de la diffraction dans un microscope

Sommaire

4.1	Le contexte	51
4.1.1	Focalisation du faisceau excitateur	52
4.1.2	Émission et collection de la fluorescence	52
4.2	Hypothèses et approximations	53
4.2.1	Hypothèses sur l'homogénéité de l'échantillon	53
4.2.2	Hypothèses sur les champs	54
4.2.3	Hypothèses sur le matériel	54
4.3	Calculs de diffraction dans un microscope	56
4.3.1	Focalisation du faisceau excitateur	56
4.3.2	La fluorescence	59
4.4	Quelques applications préliminaires	63
4.4.1	Détermination de l'orientation de molécules	63
4.4.2	Modification du volume d'excitation	66

4.1 Le contexte

Dès 1909, P. Debye [50] développa une théorie scalaire pour calculer l'effet diffractif d'une lentille à forte ouverture numérique sur un faisceau spatialement cohérent non polarisé. Cette méthode sera reprise et développée par J. Picht [51] en 1925. A la différence du principe de Huygens-Fresnel qui

consiste à décomposer le front d'onde en ondes sphériques cohérentes, pour le faire propager, la théorie de Debye projette le front d'onde sur une base d'ondes planes. En 1959, J. B. Keller [52, 53] dans le domaine des micro-ondes et B. Richards et E. Wolf [54, 55] dans le domaine du visible (400 nm à 800 nm environs), ont publié des méthodes géométriques comparables pour résoudre le problème de la diffraction vectorielle de champs polarisés. Cette théorie, qui est en fait un cas particulier d'un résultat obtenu par R. K. Luneberg [56] en 1944, permet donc de travailler sur la modélisation de nombreuses expériences telles que, par exemple, la focalisation par un objectif de microscope d'un faisceau Laser polarisé.

4.1.1 Focalisation du faisceau exciteur

Finale­ment, dès 1959, B. Richards et E. Wolf ont modélisé de manière relativement¹ rigoureuse la focalisation d'un faisceau spatialement cohérent et polarisé, par un objectif à forte ouverture numérique, dans un milieu homogène. Ils ont ainsi résolu une partie du problème de l'excitation dans un microscope. A partir de 1976, Gasper et al. [57] ont entrepris de résoudre le problème en tenant compte de la présence de la lamelle de microscope devant l'échantillon [58–62] et donc de son effet réfractif sur le faisceau focalisé. Le lecteur intéressé pourra se reporter à l'article de Wiersma et al. [63] qui compare deux approches [64, 65] parmi les plus récentes pour résoudre rigoureusement le problème de la propagation d'un faisceau fortement focalisé à travers une surface plane comme la lamelle. Au début des années 90, les équipes de C. J. R. Sheppard et de E. H. K. Stelzer ont utilisé la méthode de B. Richards et E. Wolf pour montrer que les interférences entre deux faisceaux contrapropagatifs [17] au foyer d'un 4π -microscope permettaient d'augmenter sensiblement la résolution axiale [16, 66] en microscopie confocale.

4.1.2 Émission et collection de la fluorescence

A l'inverse de l'excitation, l'émission de fluorescence et sa collection par un objectif à forte ouverture numérique, n'ont été que tardivement modélisées. Certains comme S. Hell [16] ont simplement considéré que l'émission était comparable à l'excitation mais de longueur d'onde différente. Ils n'ont tenu compte ni de la forme de l'émission, ni même de sa largeur spectrale. Récemment, les biologistes ont commencé à s'intéresser à l'orientation de certaines molécules. Dans ce contexte, J. Enderlein, a proposé une méthode

¹Nous verrons dans le chapitre 4.2.1 les quelques approximations faites dans ce calcul.

simple d'imagerie qui permet de connaître l'orientation de certains fluorophores [67–69]. Il a considéré que la fluorescence était proche de l'émission dipolaire et a adapté la méthode de B. Richards et E. Wolf, à un système confocal². Ce qui lui a permis de calculer l'image d'un fluorophore en fonction de son orientation et de sa position par rapport au plan focal de l'objectif. Comme pour l'excitation l'effet de la lamelle sur l'émission de fluorescence a été ensuite étudié en détail [68, 70–72].

4.2 Hypothèses et approximations

4.2.1 Hypothèses sur l'homogénéité de l'échantillon

Dans toute cette partie nous ferons l'hypothèse que ni la lamelle de microscope sur laquelle est posé l'échantillon à observer, ni l'échantillon lui-même n'ont d'influence sur la forme des faisceaux d'excitation et d'émission. Les lamelles de microscope ont la plupart du temps un indice optique égal à 1,5 et les échantillons biologiques constitués en majorité d'eau un indice proche de 1,33. Il est donc certain que les deux hypothèses précédentes peuvent être assez gênantes dans certains cas, comme par exemple avec des objectifs fonctionnant dans l'air. En fait la plupart du temps nous travaillons avec des objectifs à immersion dans l'huile ($n=1,518$), dans le glycérol [73] ($n=1,45$) ou dans l'eau ($n=1,33$) c'est pourquoi les effets de réfraction et de réflexion de la lamelle et de l'échantillon peuvent être négligés. De même l'absorption est elle aussi le plus souvent négligeable sauf lorsque les échantillons biologiques sont très épais. Dans ce cas nous verrons qu'il est intéressant de travailler avec des longueurs d'onde dans l'infrarouge [6].

Cette hypothèse selon laquelle ni la lamelle ni l'échantillon n'ont d'effets importants sur la propagation des champs, nous conduit donc à utiliser une méthode géométrique basée sur celle de Richards et Wolf pour modéliser le faisceau exciteur et sur celle de Enderlein et al. pour l'émission de fluorescence. Bien que ces deux calculs soient vectoriels et rigoureux, ils ne tiennent pas compte des effets de polarisation au niveau des surfaces des nombreuses lentilles du microscope, nous verrons donc dans le chapitre 4.2.3 les hypothèses faites sur le matériel lui-même.

²A la différence de la méthode Richards et Wolf, celle d'Enderlein permet de faire propager les champs du foyer objet de l'objectif jusqu'au foyer image de la lentille de tube.

4.2.2 Hypothèses sur les champs

L'excitation

Dans la suite nous considérerons généralement les faisceaux excitateurs comme étant monochromatiques, gaussiens et polarisés linéairement. Cependant ces trois caractéristiques sont facilement modifiables dans le calcul et nous verrons donc des résultats avec d'autres formes de faisceau et d'autres polarisations.

L'émission de fluorescence

Nous ne considérerons que des fluorophores ayant un groupement fonctionnel d'émission dipolaire, c'est-à-dire que nous assimilerons simplement le fluorophore à un dipôle. En réalité les fluorophores sont des molécules de forme parfois très complexe, il est donc fréquent que la fluorescence ne soit pas simplement une émission dipolaire. C'est en fait une superposition cohérente d'émissions dipolaires, il est donc possible de résoudre le problème en considérant chaque dipôle individuellement, en sommant ensuite les champs. Cependant des fluorophores très simples et très courants comme les cyanines peuvent être réellement modélisés par un dipôle unique [68, 69]. La figure 4.1 représente une molécule de cyanine 5, sa forme plutôt allongée nous permet de l'assimiler à un dipôle.

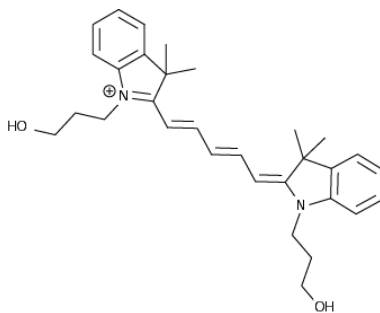
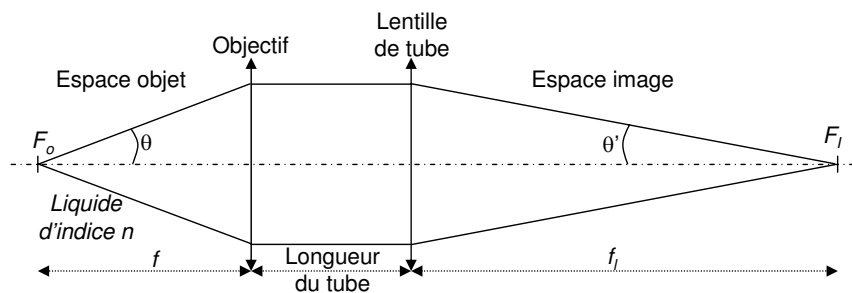


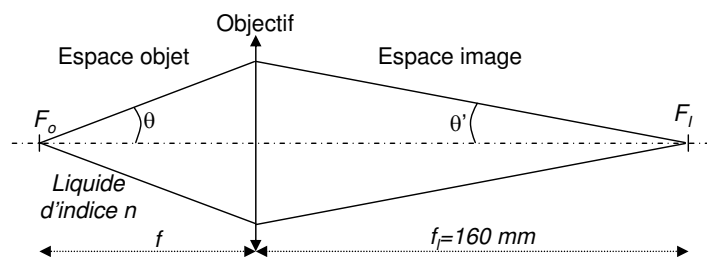
FIG. 4.1 – Molécule de Cyanine 5 se comportant comme un dipôle à l'émission

4.2.3 Hypothèses sur le matériel

Rappelons qu'en principe un microscope est un système confocal constitué d'un objectif et d'une lentille de tube. Les microscopes commerciaux de qualité peuvent être considérés comme des systèmes sans aberration

FIG. 4.2 – *Microscope moderne constitué de deux lentilles minces*

géométrique ni chromatique. Dans les calculs nous avons donc considéré que l'objectif et la lentille de tube étaient des lentilles minces sans aberration chromatique. La longueur du tube représentée sur la figure 4.2 sera en fait considérée comme nulle; remarquons que ce système se retrouve dans les anciens microscopes qui utilisaient des objectifs qui formaient directement l'image à une distance de 160 mm du plan principal (fig.4.3) alors qu'aujourd'hui les objectifs renvoient, le plus souvent, l'image à l'infini. Les deux hypothèses, sur l'épaisseur des lentilles et la longueur du tube, ne sont pas très gênantes puisqu'elles ne font intervenir qu'un terme de phase qui disparaît dans le calcul final de l'intensité détectée en sortie du microscope.

FIG. 4.3 – *Ancien microscope sans lentille de tube*

Rappelons qu'un microscope est décrit par quatre grandeurs dont trois concernent uniquement l'objectif : l'*ouverture numérique* (\mathbf{NA}), l'*indice d'immersion* (\mathbf{n}) et la *distance focale*; le *grossissement* (\mathbf{m}) fait intervenir la distance focale de la lentille de tube (lentille de Telan) f_i .

$$NA = n \sin \theta \quad (4.1)$$

$$m = \frac{nf_l}{f} \quad (4.2)$$

avec θ l'angle maximal de collection de l'objectif.

4.3 Calculs de diffraction dans un microscope

4.3.1 Focalisation du faisceau exciteur

Plaçons nous dans un cas simple et pratique : le mode fondamental gaussien TEM00 d'un laser monochromatique polarisé selon le vecteur \vec{p}_o . Dans le plan juste avant l'objectif (Cf. fig. 4.4), l'amplitude du champ est représentée spatialement par une gaussienne en 2 dimensions d'équation³ :

$$E_p(h) \propto \exp \left[- \left(\frac{h}{\sigma_g} \right)^2 \right] \quad (4.3)$$

avec σ_g qui est la largeur de la gaussienne et h la position radiale dans le plan. Remarquons sur la figure 4.4 que :

$$h = f \sin \theta \quad (4.4)$$

et que donc :

$$NA = \frac{n d}{2f} \quad (4.5)$$

avec d le diamètre de la lentille. En introduisant, comme S.T. Hess et W.W. Webb dans [74], le coefficient β qui est le rapport du rayon de l'objectif sur la largeur de la gaussienne, nous obtenons une nouvelle expression de l'amplitude du champ incident en fonction des coordonnées sphériques θ et φ :

$$E_p(\theta, \varphi) \propto \exp \left[- \left(\frac{n\beta \sin \theta}{NA} \right)^2 \right] \quad (4.6)$$

En effet, d'après les équations précédentes (4.4) et (4.5) :

$$h = \frac{n d \sin \theta}{2 NA} \quad (4.7)$$

$$\beta = \frac{d}{2 \sigma_g} \quad (4.8)$$

³Il est à noter que dans ces calculs, nous négligeons la faible divergence du faisceau avant l'objectif.

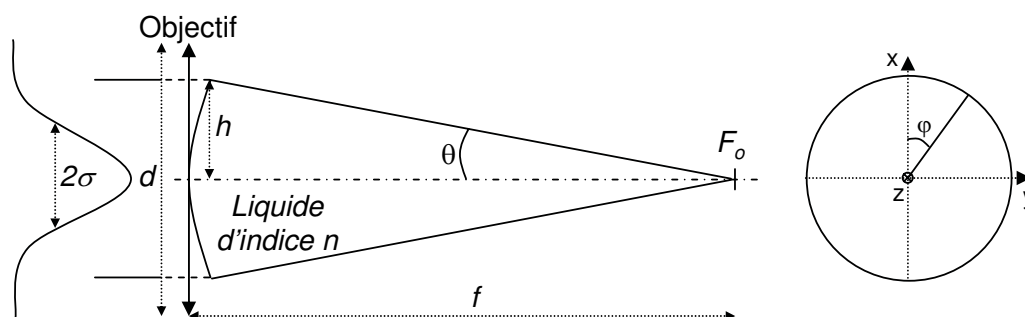


FIG. 4.4 – Focalisation d'un faisceau gaussien par un objectif de microscope

Passage à travers l'objectif

Pour passer du plan P qui est situé juste devant l'objectif à la sphère⁴ S qui est juste après (cf. fig.4.4), Richards et Wolf [55] ont montré qu'il faut tenir compte du facteur de conservation de l'énergie à travers les surfaces.

$$E_p^2 \cdot dS_{plan} = E_s^2 \cdot dS_{sphere} \quad (4.9)$$

Or

$$dS_{plan} = dS_{sphere} \cos \theta \quad (4.10)$$

L'amplitude du champ sur la sphère dans un milieu d'indice n devient donc :

$$E_s(\theta, \varphi) \propto \sqrt{n \cos \theta} \cdot \exp \left[- \left(\frac{n\beta \sin \theta}{NA} \right)^2 \right] \quad (4.11)$$

De même à la traversée de l'objectif, la polarisation \vec{p}_o tourne de façon à rester orthogonale au vecteur d'onde \vec{k} . Prenons le cas simple d'une polarisation rectiligne :

$$\vec{p}_o = \begin{pmatrix} \cos(\alpha) \\ \sin(\alpha) \\ 0 \end{pmatrix} \quad (4.12)$$

$$\vec{k} = \frac{2\pi}{\lambda} \begin{pmatrix} \sin(\theta) \cos(\varphi) \\ \sin(\theta) \sin(\varphi) \\ \cos(\theta) \end{pmatrix} \quad (4.13)$$

⁴S est la sphère de centre le foyer F_o de l'objectif et de rayon sa focale.

La polarisation devient donc :

$$\vec{p} = \frac{1}{\|\vec{p}\|} \begin{pmatrix} \cos(\theta) \cos(\alpha) \\ \cos(\theta) \sin(\alpha) \\ -\sin(\theta) [\cos(\varphi) \cos(\alpha) + \sin(\varphi) \sin(\alpha)] \end{pmatrix} \quad (4.14)$$

avec $\|\vec{p}\|$ qui est la norme de \vec{p} . Par cette transformation géométrique nous pouvons calculer l'effet de l'objectif sur n'importe quelle autre polarisation puisqu'elle peut être décomposée sur une base de polarisations rectilignes. Le champ $\vec{E}_p = E_p \vec{p}_o$ dans le plan P précédent l'objectif est donc transformé par l'objectif en $\vec{E}_s = E_s \vec{p}$ sur la sphère S. Il est à noter que le champ \vec{E}_p et l'amplitude E_s sont invariants selon la coordonnée φ parce que l'amplitude du champ incident est de symétrie de révolution autour de l'axe optique. Par contre le champ \vec{E}_s dépend de φ , ce qui signifie qu'il y a une brisure de symétrie au passage de l'objectif. Nous verrons que ceci peut être gênant pour certaines applications, il sera donc intéressant d'étudier des cas non polarisés rectilignement.

Propagation du champ en milieu homogène

Parce que la propagation du champ \vec{E}_s de la sphère S jusqu'au voisinage du foyer de l'objectif a lieu en milieu homogène⁵, nous décomposons le front d'onde, en ondes planes. En prenant le foyer F_o comme centre du repère, le champ, au point M de coordonnées (x,y,z), est donc :

$$\vec{E}(x, y, z) = \iint_{\Omega} \vec{E}_s(\theta, \varphi) \exp \left[i \left(\vec{k} \cdot \vec{F}_o \vec{M} \right) \right] d\Omega \quad (4.15)$$

avec Ω qui est l'angle solide délimité par l'ouverture numérique et \vec{k} le vecteur d'onde donné à l'équation (4.13). En explicitant Ω en fonction des coordonnées sphériques θ et φ , nous obtenons l'intégrale :

$$\vec{E}(x, y, z) \propto \int_{-\pi}^{\pi} \int_0^{\theta_{max}} \vec{E}_s(\theta, \varphi) \exp \left[i \left(\vec{k} \cdot \vec{F}_o \vec{M} \right) \right] \sin(2\theta) d\theta d\varphi \quad (4.16)$$

avec

$$\vec{k} \cdot \vec{F}_o \vec{M} = \frac{2\pi}{\lambda} [\sin \theta (x \cos \varphi + y \sin \varphi) + z \cos \theta] \quad (4.17)$$

⁵Nous négligeons les effets de la lamelle et de l'échantillon sur le champ (cf chapitre 4.2.1).

L'intensité au point M est donnée par le produit scalaire :

$$I(x, y, z) = \vec{E} \cdot \vec{E}^* \quad (4.18)$$

avec \vec{E}^* le complexe conjugué de \vec{E} . Notons que pour un faisceau non polarisé $\vec{p} = 1$. Dans ce cas le calcul précédent se simplifie et nous ramène à la théorie de Debye [50].

4.3.2 La fluorescence

Considérons un fluorophore placé au voisinage du foyer objet de l'objectif de microscope. Comme nous l'avons vu précédemment cette molécule est assimilée à un dipôle. Le but du calcul qui va suivre est de connaître le champ émis par ce dipôle au voisinage du foyer image de la lentille de tube. La Figure 4.5 représente un dipôle qui rayonne au point M un champ électrique de la forme :

$$\vec{E} \approx \frac{1}{4\pi\epsilon_0} \left(\frac{-k^2 p_0 \sin \theta}{r} \right) \exp(ikr) \vec{e}_\theta \quad (4.19)$$

Ce point M est situé à une grande distance de sorte que les composantes évanescentes du champ dipolaire en $1/r^2$ et $1/r^3$ soient négligeables. Dans la suite nous verrons que les distances s'expriment en millimètres justifiant l'approximation.

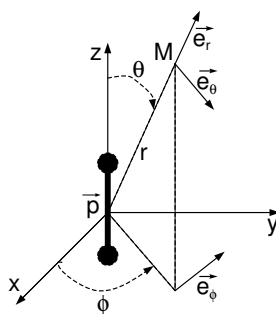


FIG. 4.5 – Dipôle oscillant rayonnant à grande distance

Propagation dans l'espace objet

Dans un premier temps, nous devons exprimer le champ émis par le dipôle sur la sphère objet SO (cf. fig.4.6) de centre le foyer Fo de l'objectif

et de rayon sa focale. Ce champ, qui dépend donc de la position du dipôle par rapport au foyer de l'objectif \vec{pos} et de son orientation dans l'espace représentée par le vecteur normé \vec{p} , s'écrit :

$$\vec{E}_o(\theta, \varphi, \vec{p}, \vec{pos}) \propto \frac{-k^2 p_0}{r_d} \exp(i k n r_d) (\vec{p}_\perp \cdot \vec{e}_{rd}) \vec{e}_{\theta d} \quad (4.20)$$

$$\text{avec } \begin{cases} \vec{e}_{\theta d} = (\vec{p} \cdot \vec{e}_{rd}) \vec{p}_\perp - (\vec{p}_\perp \cdot \vec{e}_{rd}) \vec{p} \\ \vec{p}_\perp = \frac{\vec{e}_{rd} - (\vec{p} \cdot \vec{e}_{rd}) \vec{p}}{\sqrt{1 - (\vec{p} \cdot \vec{e}_{rd})^2}} \\ \vec{e}_{rd} = \frac{f \vec{e}_r - \vec{pos}}{r_d} \\ r_d = \sqrt{f^2 - 2f(\vec{e}_r \cdot \vec{pos}) + \|\vec{pos}\|^2} \end{cases} \quad (4.21)$$

avec p_0 la longueur du dipôle, n l'indice du liquide d'immersion de l'objectif et $k = \frac{2\pi}{\lambda}$. Nous avons exprimé le champ en fonction des vecteurs $[\vec{e}_r, \vec{e}_\theta, \vec{e}_\varphi]$ de la base sphérique liée à la sphère SO pour pouvoir utiliser la méthode de Richards et Wolf pour passer d'un côté à l'autre de la lentille.

$$\begin{cases} \vec{e}_r = \begin{pmatrix} \sin(\theta) \cos(\varphi) \\ \sin(\theta) \sin(\varphi) \\ \cos(\theta) \end{pmatrix} \\ \vec{e}_\theta = \begin{pmatrix} \cos(\theta) \cos(\varphi) \\ \cos(\theta) \sin(\varphi) \\ -\sin(\theta) \end{pmatrix} \\ \vec{e}_\varphi = \begin{pmatrix} -\sin(\varphi) \\ \cos(\varphi) \\ 0 \end{pmatrix} \end{cases} \quad (4.22)$$

Passage dans l'espace image

Le passage de la sphère objet SO à la sphère image SI (cf. fig.4.6) se fait par deux transformations comparables à celles décrites par Richards et Wolf [55]. La transformation vectorielle s'obtient par un changement de base de $[\vec{e}_r, \vec{e}_\theta, \vec{e}_\varphi]$ à $[\vec{e}'_r, \vec{e}'_\theta, \vec{e}'_\varphi]$ (la base sphérique associée à la sphère SI).

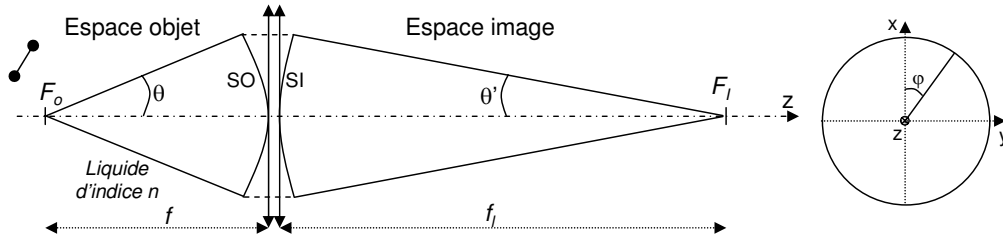


FIG. 4.6 – Microscope formant un système confocal constitué de deux lentilles minces accolées

Notons que le passage de la base sphérique "objet" à la base sphérique "image" s'obtient en remplaçant θ par $-\theta'$ avec :

$$\theta' = \arcsin \left(\frac{n \sin \theta}{M} \right) \quad (4.23)$$

$$\left\{ \begin{array}{l} \vec{e}'_r = \begin{pmatrix} -\sin(\theta') \cos(\varphi) \\ -\sin(\theta') \sin(\varphi) \\ \cos(\theta') \end{pmatrix} \\ \vec{e}'_\theta = \begin{pmatrix} \cos(\theta') \cos(\varphi) \\ \cos(\theta') \sin(\varphi) \\ \sin(\theta') \end{pmatrix} \\ \vec{e}'_\varphi = \begin{pmatrix} -\sin(\varphi) \\ \cos(\varphi) \\ 0 \end{pmatrix} \end{array} \right. \quad (4.24)$$

La conservation de l'énergie à travers les deux surfaces sphériques s'obtient par un facteur [67, 68] lié au grossissement m du microscope :

$$G = m \sqrt{\frac{\cos \theta'}{n \cos \theta}} \quad (4.25)$$

Finalement le champ sur la sphère image SI s'écrit :

$$\vec{E}_i(\theta', \varphi) \propto G \left[\left(\vec{E}_o \cdot \vec{e}_r \right) \vec{e}'_r + \left(\vec{E}_o \cdot \vec{e}_\theta \right) \vec{e}'_\theta + \left(\vec{E}_o \cdot \vec{e}_\varphi \right) \vec{e}'_\varphi \right] \quad (4.26)$$

Remarquons que pour un dipôle placé au foyer objet ce champ se simplifie en :

$$\vec{E}_i(\theta', \varphi, \vec{p}, 0) \propto \frac{G k^2 p_0}{f} \exp(i k n f) \left[\left(\vec{p} \cdot \vec{e}_\theta \right) \vec{e}'_\theta + \left(\vec{p} \cdot \vec{e}_\varphi \right) \vec{e}'_\varphi \right] \quad (4.27)$$

Propagation dans l'espace image

Pour avoir le champ en tous points $M(x,y,z)$ de l'espace image, nous faisons une décomposition du champ en ondes planes.

$$\vec{E}(x, y, z, \vec{p}, \vec{pos}) \propto \iint_{\Omega} \vec{E}_i \exp \left[i \left(\vec{k} \cdot \vec{F}_l M \right) \right] d\Omega \quad (4.28)$$

avec Ω l'angle solide délimité par l'ouverture numérique de l'objectif et

$$\vec{k} = \frac{2\pi}{\lambda} \frac{f \vec{e}'_r - \vec{pos}}{\sqrt{f^2 - 2f (\vec{e}'_r \cdot \vec{pos}) + \|\vec{pos}\|^2}} \quad (4.29)$$

$$d\Omega = \frac{dk_x dk_y}{k^2} \quad (4.30)$$

Pour faire le changement de variables (k_x, k_y) en (θ', φ) nous devons calculer le Jacobien⁶ du système. En effet, $dk_x dk_y = Jac d\theta' d\varphi$.

$$Jac(\theta', \varphi, \vec{pos}) = \frac{k^2 f^2 \sin \theta'}{\Sigma} \left\{ \cos \theta' - \frac{[f \sin \theta' + (\vec{pos} \cdot \vec{e}_{\varphi\perp})] (\vec{e}'_{\theta} \cdot \vec{pos})}{\Sigma} + \frac{\cos \theta' (\vec{pos} \cdot \vec{e}_{\varphi})^2}{\Sigma} \right\} \quad (4.31)$$

$$\text{avec } \begin{cases} \Sigma = f^2 - 2f (\vec{e}'_r \cdot \vec{pos}) + \|\vec{pos}\|^2 \\ \vec{e}_{\varphi\perp} = \begin{pmatrix} \cos(\varphi) \\ \sin(\varphi) \\ 0 \end{pmatrix} \end{cases} \quad (4.32)$$

Dans ce cas le champ, en tous points de l'espace image M^l , s'exprime sous la forme :

$$\vec{E}(\vec{F}_l M, \vec{p}, \vec{pos}) \propto \int_{-\pi}^{\pi} \int_0^{\theta'_{max}} \vec{E}_i \exp \left[i \left(\vec{k} \cdot \vec{F}_l M \right) \right] Jac d\theta' d\varphi \quad (4.33)$$

$${}^6 Jac = \begin{vmatrix} \frac{\partial k_x}{\partial \theta} & \frac{\partial k_x}{\partial \varphi} \\ \frac{\partial k_y}{\partial \theta} & \frac{\partial k_y}{\partial \varphi} \end{vmatrix}$$

$${}^7 \vec{O}_i M = \begin{pmatrix} x \\ y \\ z \end{pmatrix}$$

Par conséquent pour un dipôle placé au foyer objet le calcul du champ se simplifie notamment parce que le Jacobien et le vecteur \vec{k} deviennent :

$$Jac(\theta', \varphi, \vec{0}) = k^2 \sin \theta' \cos \theta' \quad (4.34)$$

$$\vec{k} = k \vec{e}'_r \quad (4.35)$$

avec l'expression de $\vec{E}_i(\theta', \varphi, \vec{p}, \vec{0})$ exprimée en 4.27.

4.4 Quelques applications préliminaires

Dans ce paragraphe, nous allons voir deux applications directement issues des calculs précédents : la détermination de l'orientation de certains fluorophores et le réglage des dimensions du volume d'excitation pour des applications en Spectroscopie de Corrélation de Fluorescence (FCS).

4.4.1 Détermination de l'orientation de molécules

Dans le paragraphe précédent, nous avons déterminé le champ (dans le plan image d'un microscope) émis par un fluorophore⁸ situé dans l'espace objet en fonction notamment de son orientation. A partir des équations (4.33) et (4.18), nous pouvons donc calculer l'intensité vue par une caméra en chaque point du plan focal image du microscope. La figure 4.7 nous montre les images de dipôles orientés perpendiculairement **(a)** et **(c)** et parallèlement à l'axe optique **(b)** et **(d)**. En **(a)** et **(b)** les dipôles sont au foyer tandis qu'en **(c)** et **(d)** ils sont situés à 500 nanomètres le long de l'axe. Nous pouvons constater que chaque image est différente. Lorsque l'axe des molécules est parallèle à l'axe optique, l'image est formée d'un trou au centre (l'intensité y est nulle) et le signal est plus faible. Lorsque le fluorophore n'est pas dans le plan focal, l'image est élargie. Dans ces conditions, une caméra peut arriver à détecter les différentes formes des images. C'est pourquoi Enderlein a eu l'idée d'utiliser des images défocalisées de molécules de Cyanine 5 figées dans de la gélatine pour déterminer leur orientation [68]. A partir de la figure 4.8, une simple procédure de reconnaissance de forme lui a permis de remonter à l'orientation de chaque molécule [69]. Remarquons que cette technique est particulièrement intéressante puisque de nouvelles caméras ultrasensibles font leur apparition. Il est donc de plus en plus envisageable de déterminer en temps réel l'orientation de certains luminophores dans des milieux moins visqueux qu'un polymère comme par exemple une membrane cellulaire.

⁸Le fluorophore est assimilé à un dipôle.

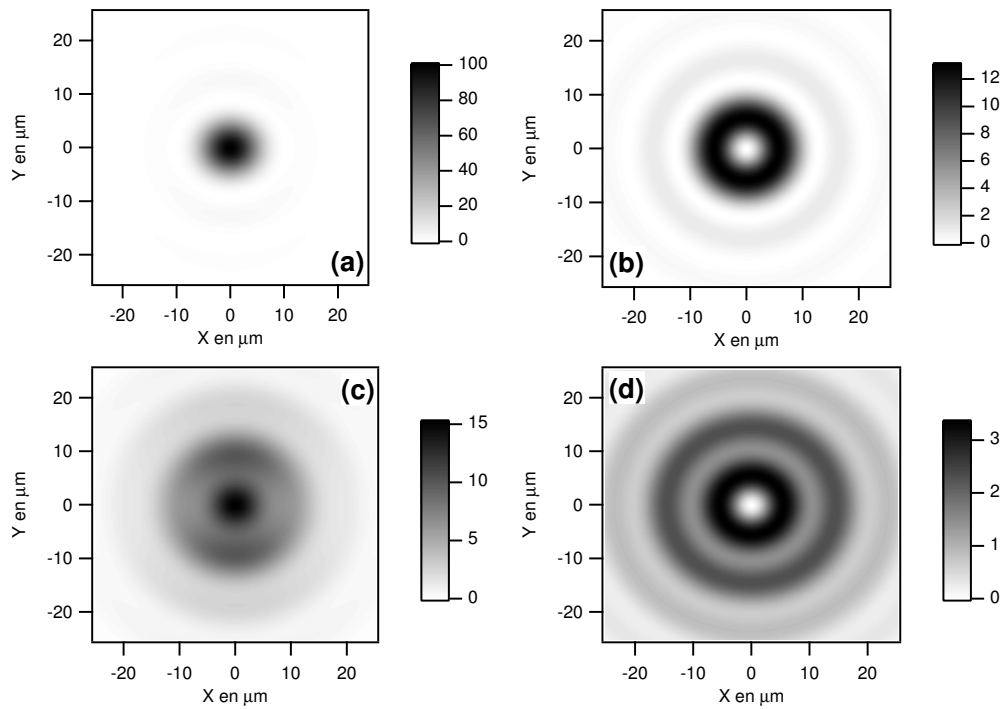


FIG. 4.7 – Images de dipôles orientés perpendiculairement **(a)** et **(c)** et parallèlement à l'axe optique **(b)** et **(d)**. En **(a)** et **(b)** les dipôles sont au foyer tandis qu'en **(c)** et **(d)** ils sont situés à 500 nanomètres le long de l'axe. L'objectif est à forte ouverture numérique $NA=1.3$ dans l'huile ($n=1.518$) et le grossissement est $m=40$. La fluorescence est considérée comme monochromatique ($\lambda=525$ nm).

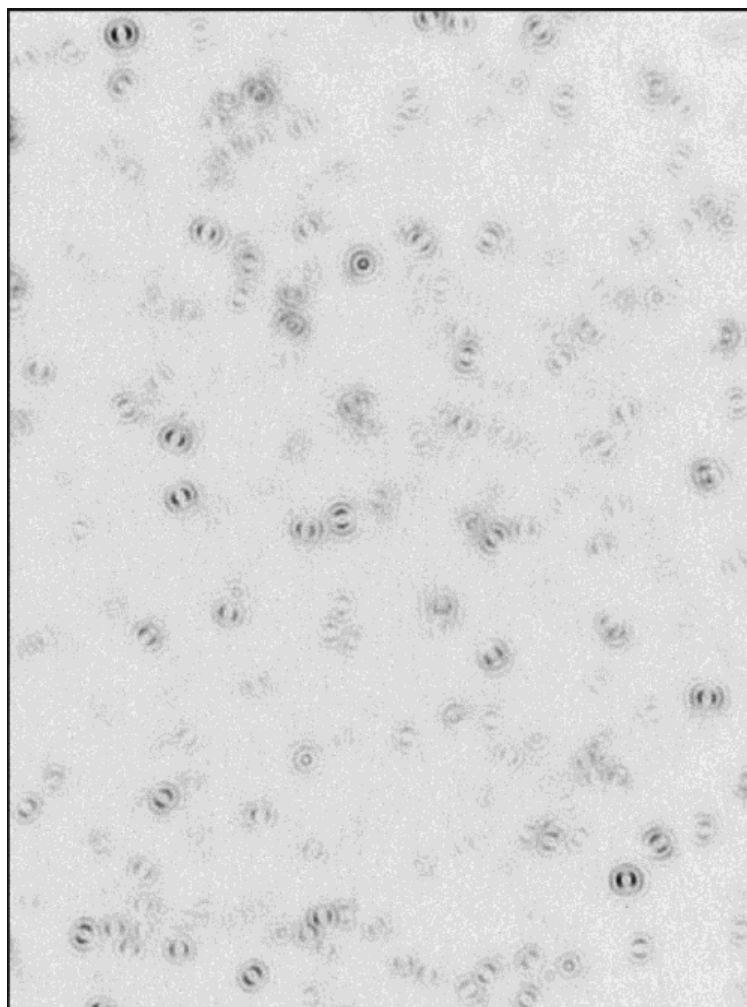


FIG. 4.8 – Images de molécules de Cyanine 5 piégées dans un polymère et situées à 1 micron du plan focal de l'objectif. Photo extraite de [69].

4.4.2 Modification du volume d'excitation

L'étude de la diffusion de protéines ou de certains lipides dans les membranes cellulaires donne de nombreuses informations par exemple sur la structure de ces membranes. Une des méthodes utilisée dans l'équipe Mosaic de l'Institut Fresnel consiste à établir des lois de diffusion par spectroscopie de corrélation de fluorescence (FCS). Les mesures de temps de diffusion sont réalisées à différentes échelles spatiales, c'est à dire à différentes tailles du volume de détection [75]. Plusieurs paramètres sont ajustables pour faire varier ce volume confocal (utilisation d'objectifs d'ouverture numérique et de grossissement différents, utilisation de longueurs d'ondes variables, ...). Néanmoins pour avoir une déformation continue du volume, la méthode la plus simple est de modifier la taille du faisceau excitateur. Deux techniques simples sont utilisées : l'une consiste à utiliser un élargisseur de faisceau pour modifier le paramètre β de l'équation (4.6) [76], l'autre (utilisée dans l'équipe) consiste à tronquer le faisceau excitateur à l'aide d'un diaphragme à iris réglable placé devant l'objectif. Lorsque le diaphragme est ouvert, c'est à dire lorsque son diamètre est supérieur à celui de la lentille d'entrée de l'objectif, le volume d'excitation est défini par la formule (4.16). Par contre dès qu'il commence à être la pupille limitante, nous pouvons donner une bonne approximation du champ dans le plan focal, en faisant la transformée de Fourier du faisceau tronqué. Dans ce cas, il s'écrit :

$$\vec{E}(x, y, 0) = TF(\vec{E}_p) * TF(Iris) \quad (4.36)$$

où le symbole $*$ représente le produit de convolution et la fonction $TF()$ la transformée de Fourier. La figure 4.9 représente deux volumes d'excitation ; en **(a)** l'objectif limite (seul) le faisceau pompe et en **(b)** le diamètre de l'iris est deux fois plus petit (5 mm) que celui de la lentille d'entrée de l'objectif. Remarquons que cette technique ne permet que d'augmenter les volumes d'excitation, il sera donc nécessaire d'utiliser une autre méthode pour prolonger les lois de diffusion vers les volumes plus petits que ceux permis par les lois de la diffraction.

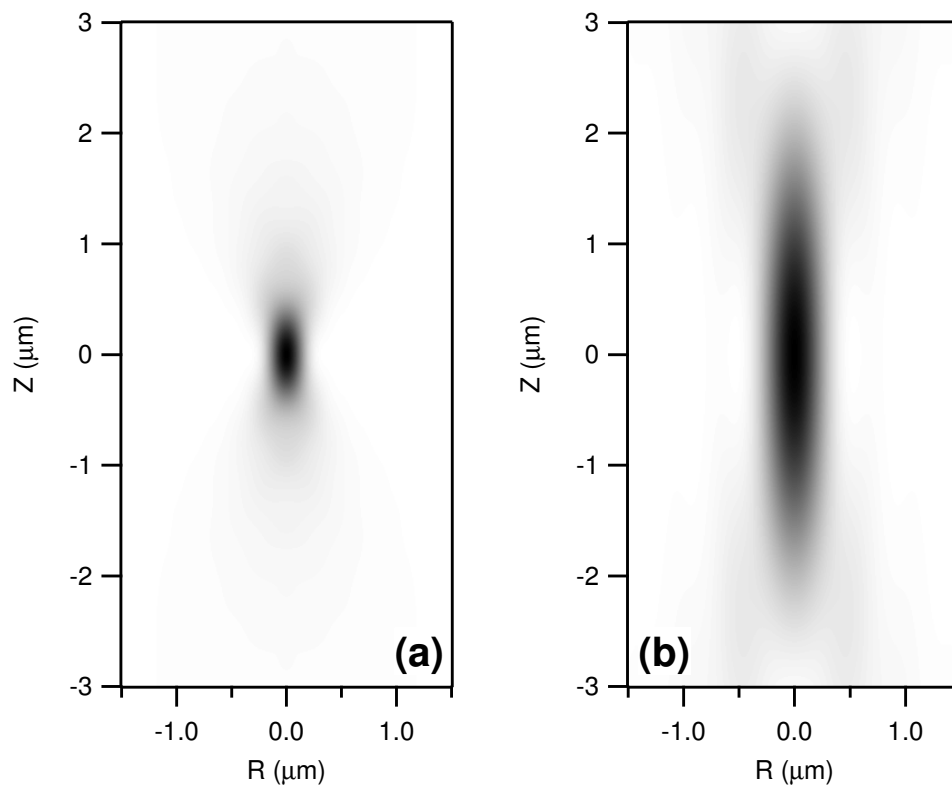


FIG. 4.9 – Volumes d'excitation; en (a) l'objectif limite le faisceau et en (b) le diamètre de l'iris est deux fois plus petit que celui de la lentille d'entrée de l'objectif. $NA=1.2$ dans l'eau, $\lambda=488$ nm et $\beta=1$.

Chapitre 5

Application au calcul de la résolution dans les microscopes confocaux à fluorescence

Sommaire

5.1	Microscopie confocale de fluorescence	70
5.1.1	Description d'un microscope confocal classique . . .	71
5.1.2	Hypothèses	72
5.1.3	Calcul de la MDE	73
5.2	4π-microscopie	87
5.2.1	La résolution dans un 4π -microscope de type A . .	90
5.2.2	La résolution dans un 4π -microscope de type C . .	92
5.2.3	4π -microscopie à deux photons	99
5.3	4π-microscope modifié	101
5.3.1	Description de la méthode	101
5.3.2	Calcul de la CEF	103
5.3.3	4π -microscope modifié à 1 ou 2 photons	108
5.3.4	Comparaison des volumes de détection	110
5.3.5	Application expérimentale	112
5.3.6	Microscopie à bioluminescence	112

Introduction

Dans de nombreux systèmes optiques¹, les phénomènes de diffraction nous empêchent de distinguer les objets trop proches les uns des autres. La distance minimale pour laquelle l'observateur les distingue définit la résolution du système. En microscopie les objets peuvent être cohérents ou non entre eux. C'est Ernst Abbe [9] qui le premier a défini le pouvoir de résolution d'un microscope en éclairage cohérent. Sa célèbre formule

$$d_{Abbe} \geq \frac{\lambda}{2NA} \quad (5.1)$$

détermine l'écart minimal qu'il doit y avoir transversalement entre deux objets pour les voir avec un microscope ayant un objectif d'ouverture numérique NA et un éclairage à la longueur d'onde λ . En éclairage incohérent, c'est le critère de Rayleigh [10] qui est utilisé.

$$d_R = \frac{1.22\lambda}{2NA} \quad (5.2)$$

Cette distance d_R correspond en fait au premier zéro de la fonction d'Airy :

$$f(x) = \left[\frac{J_1\left(\frac{2\pi NA x}{\lambda}\right)}{\left(\frac{2\pi NA x}{\lambda}\right)} \right]^2 \quad (5.3)$$

Dans ce chapitre nous verrons, dans premier temps, comment est calculée la résolution dans un microscope confocal à fluorescence et quelles sont les variables accessibles expérimentalement pour modifier cette résolution. Ensuite nous décrirons les méthodes interférométriques utilisées par Hell², Sheppard et Stelzer [16,17,66] pour améliorer considérablement la résolution axiale. Enfin nous terminerons en décrivant un nouveau type de 4π -microscope qui permet d'obtenir une meilleure résolution latérale que celle donnée par la limite de diffraction et d'améliorer les avantages apportés par les 4π -microscopes classiques.

5.1 La résolution en microscopie confocale de fluorescence

Rappelons que, dans un microscope confocal, seule la lumière provenant d'une zone de l'échantillon restreinte par l'image d'un sténopé³ est détectée. Ainsi en déplaçant l'échantillon son image est obtenue point par point.

¹Télescopes, spectromètres(...) et bien sûr microscopes

²European Patent EP0491289, (24-06-1992), Classification : G02B21/00M4A

³Le sténopé est aussi appelé trou confocal.

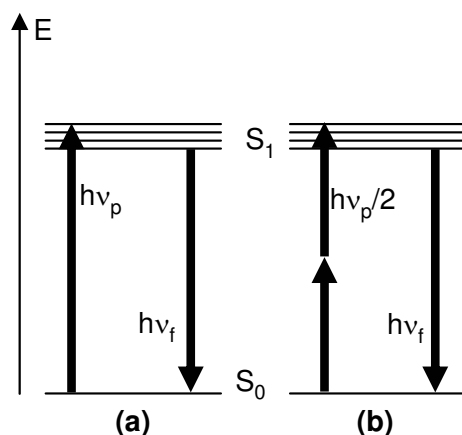


FIG. 5.1 – Diagramme de Jablonski représentant le processus de fluorescence à 1 photon (a) et à 2 photons (b).

Nous avons vu précédemment que les objets biologiques sont peu contrastés et qu'il est donc préférable de les marquer avec des luminophores. En général, ces luminophores sont excités optiquement mais certains le sont chimiquement, c'est le cas des chimico-luminophores et des bioluminophores [77] que l'on trouve, par exemple, dans les vers luisants, dans les méduses ou dans certaines bactéries [78]. La figure 5.1 représente l'absorption d'un photon par un fluorophore puis l'émission d'un autre photon moins énergétique résultat de la désexcitation de la molécule. Nous verrons qu'il est possible et qu'il peut être intéressant d'exciter les fluorophores avec deux [6, 7] voire trois photons [8].

5.1.1 Description d'un microscope confocal classique

Dans un microscope confocal comparable à celui de la figure 5.2, un faisceau Laser est complètement réfléchi par le miroir dichroïque et focalisé par l'objectif à forte ouverture numérique sur l'échantillon. Les fluorophores de l'échantillon, se trouvant dans la zone où l'intensité du faisceau focalisé est la plus forte, ont une grande probabilité d'absorber un photon et donc d'en réémettre un autre en se désexcitant. Ce signal de fluorescence est collecté sur quasiment 2π stéradians par l'objectif à forte ouverture numérique qui a servi à focaliser le faisceau excitateur : c'est ce qu'on appelle un fonctionnement en épifluorescence. La fluorescence va ensuite être complètement transmise par le miroir dichroïque et focalisée par la lentille de tube, à travers un trou

confocal, sur la photodiode. Sur la figure 5.2 le trou et la photodiode sont accolés l'un à l'autre pour simplifier les calculs, cependant, en général, ils sont situés dans deux plans conjugués par un système confocal pour des raisons de commodité expérimentale.

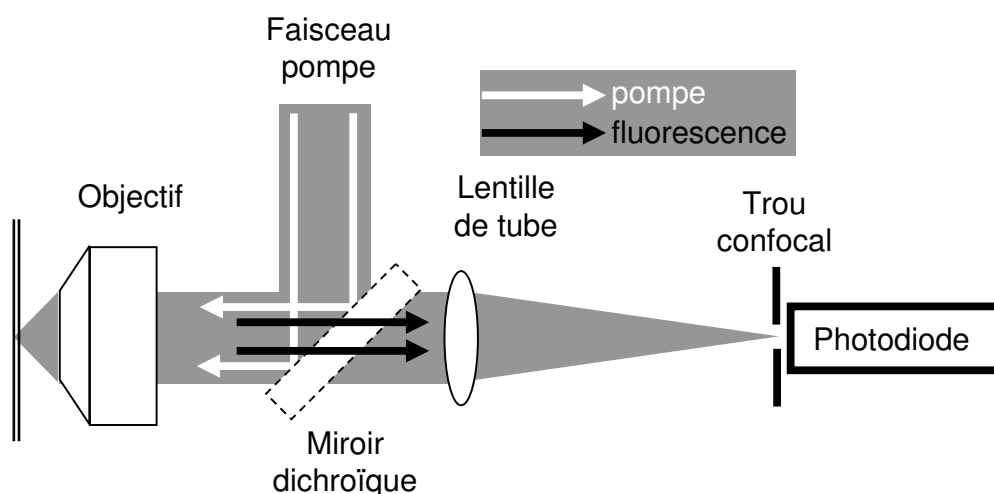


FIG. 5.2 – *Microscope confocal classique fonctionnant en épifluorescence*

5.1.2 Hypothèses

Bien que certains luminophores aient un groupement fonctionnel d'absorption de type dipolaire, c'est à dire qu'il existe des directions privilégiées pour les exciter, dans ce chapitre nous considérerons que les fluorophores absorbent de manière isotrope et que leur émission est proportionnelle à l'intensité locale du faisceau excitateur. Dans ce cas, nous pouvons dissocier le calcul de l'émission et de l'excitation. L'intensité du faisceau pompe focalisé au voisinage du foyer (et donc de l'échantillon) délimite un volume d'efficacité d'excitation (la EEF^4). L'image du trou confocal à travers le microscope définit le volume d'efficacité de collection (la CEF^5) et finalement la résolution spatiale du système est donnée par le volume d'efficacité de détection (la MDE^6) qui est le résultat du produit des deux précédents volumes d'efficacité.

$$MDE = EEF \times CEF \quad (5.4)$$

⁴Abréviation de l'expression anglaise "Excitation Efficiency Function".

⁵Abréviation de l'expression anglaise "Collection Efficiency Function".

⁶Abréviation de l'expression anglaise "Molecule Detection Efficiency".

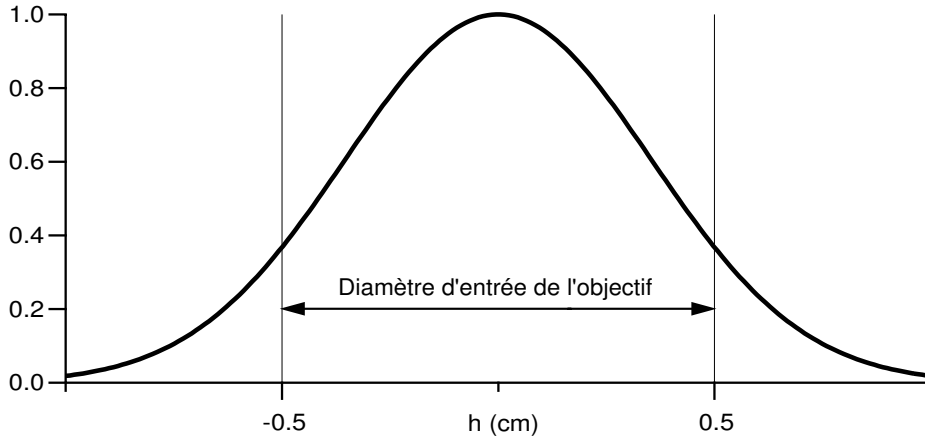


FIG. 5.3 – Amplitude d'un faisceau gaussien à l'entrée de l'objectif tel que $\beta=1$. Les deux droites verticales représentent la pupille d'entrée de l'objectif.

5.1.3 Calcul de la MDE

5.1.3.1 Calcul de la EEF

Comme nous l'avons vu précédemment dans le chapitre 4, nous savons calculer rigoureusement le champ d'un faisceau focalisé par un objectif à forte ouverture numérique, en tout point au voisinage de son foyer. Nous pouvons donc tracer la carte en trois dimensions de l'intensité du faisceau d'excitation. Rappelons qu'au point M de coordonnées (x,y,z) dans le repère cartésien de centre le foyer F_o :

$$I(x, y, z) = \vec{E} \cdot \vec{E}^* \quad (5.5)$$

avec \vec{E}^* le complexe conjugué de \vec{E} et

$$\vec{E}(x, y, z) \propto \int_{-\pi}^{\pi} \int_0^{\theta_{max}} \vec{E}_s(\theta, \varphi) e^{i\frac{2\pi}{\lambda} [\sin\theta(x \cos\varphi + y \sin\varphi) + z \cos\theta]} \sin(2\theta) d\theta d\varphi. \quad (5.6)$$

Prenons le cas "classique" d'un faisceau gaussien polarisé rectilignement selon l'axe X, alors dans le plan précédant l'objectif, le champ s'écrit :

$$\vec{E}_p(\theta, \varphi) \propto \exp \left[- \left(\frac{n\beta \sin\theta}{NA} \right)^2 \right] \vec{e}_x \quad (5.7)$$

Juste après l'objectif sur la sphère S (cf. fig.4.4) le champ est donc :

$$\vec{E}_s(\theta, \varphi) \propto \frac{\sqrt{n \cos \theta}}{\|\vec{p}\|} \exp \left[- \left(\frac{n \beta \sin \theta}{NA} \right)^2 \right] \left(\cos \theta \vec{e}_x - \sin \theta \cos \varphi \vec{e}_z \right) \quad (5.8)$$

$$\|\vec{p}\| = \sqrt{1 - (\sin \theta \sin \varphi)^2} \quad (5.9)$$

La figure 5.4 représente la carte d'intensité en trois dimensions de l'excitation dans un microscope ayant un objectif d'ouverture numérique $NA=1.45$ dans de l'huile d'indice $n=1.518$. Le faisceau pompe est gaussien polarisé rectiligne-

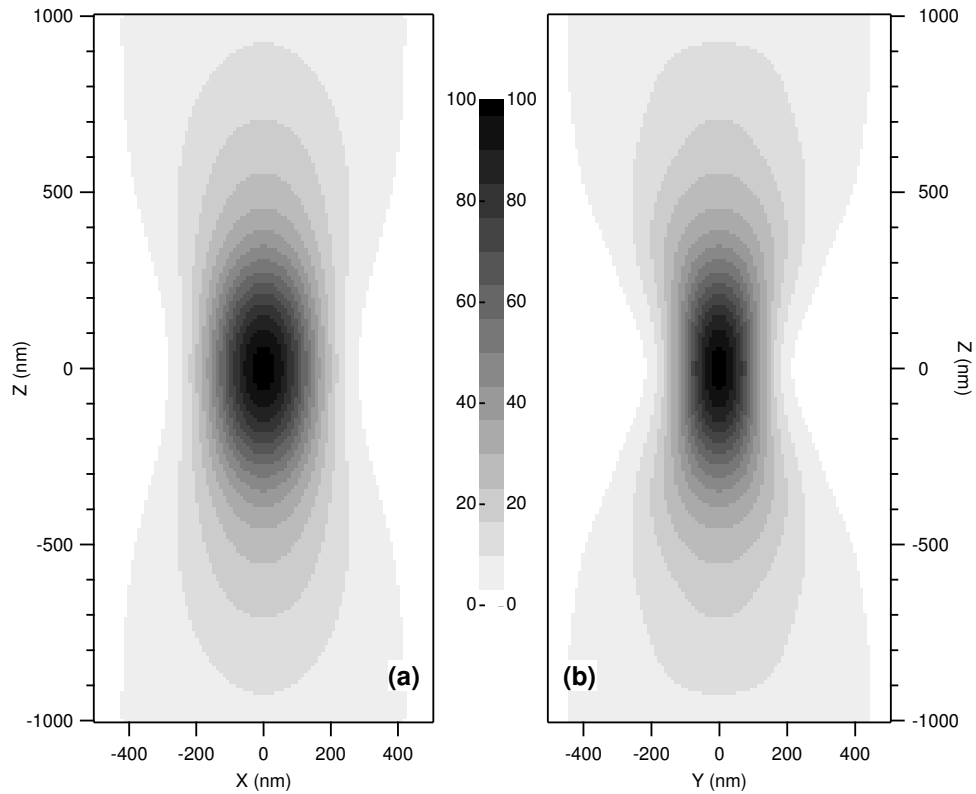


FIG. 5.4 – Volume d'efficacité d'excitation d'un faisceau ($\lambda=488\text{nm}$) gaussien ($\beta=1$) polarisé rectilignement selon X, focalisé par un objectif à forte ouverture numérique ($NA=1.45$ dans l'huile). La carte (a) représente la coupe dans le plan (XZ) tandis que la (b) représente la coupe dans le plan (YZ).

ment selon l'axe X, sa longueur d'onde⁷ est $\lambda=488\text{nm}$ et $\beta=1^8$ (cf. fig. 5.3). Nous pouvons nettement y voir les effets de la polarisation ; la largeur de la tache dans le plan focale est plus petite dans la direction orthogonale à la polarisation (en Y dans ce cas). Il est à remarquer que la valeur de l'ouverture numérique "NA=1.45" dans l'huile est l'une des plus grande disponible parmi les objectifs commerciaux⁹ [79]. En fait certains objectifs ont des ouvertures supérieures à 1.6 dans des huiles à fort indice mais ça pose certains problèmes de pénétration dans les échantillons aqueux. En effet, la loi de la réfraction de Snell-Descartes ($n_1 \sin \theta_1 = n_2 \sin \theta_2$) tend à montrer qu'il est inutile de travailler avec des objectifs d'ouverture numérique supérieure à l'indice de l'échantillon ; dans le cas d'objets biologiques dans l'eau l'ouverture numérique n'a pas besoin de dépasser 1.33. En fait, les objectifs à très forte ouverture numérique¹⁰ ($NA > 1.33$) éclairent l'échantillon aussi avec des ondes évanescentes, ce qui est utilisé dans certaines techniques de microscopie comme le TIRF¹¹.

5.1.3.2 Influence des différents paramètres sur la EEF

Influence de la polarisation

Nous venons de voir sur la figure 5.4 qu'une polarisation rectiligne dissymétrise le volume d'excitation. Sur la figure 5.5 et a fortiori sur la figure 5.6 nous pouvons constater l'importante déformation de la tache de focalisation entre la cas d'un faisceau non polarisé (**a**) et celui plus classique d'un faisceau polarisé rectilignement (**b**). Cette dissymétrie peut être gênante dans certaines applications comme en Spectroscopie de Corrélation de Fluorescence (FCS) où il faut tenir compte de la forme des volumes de détection [74,80] ou tout simplement pour faire de l'imagerie puisque la résolution sera nettement moins bonne dans une direction que dans l'autre. Une solution peut être d'utiliser un faisceau polarisé circulairement, dans ce cas les vecteurs \vec{p}_o et \vec{p}^{12} sont complexes (cf. équations (5.10) et (5.11)) mais le volume est de symétrie de révolution dans le plan focal (cf (**c**) des figures 5.5 et 5.6). Remarquons que la polarisation n'a pas d'influence significative

⁷488 nm est par exemple l'une des raies de l'Argon.

⁸ β est le rapport du rayon de l'objectif sur la largeur de la gaussienne.

⁹Nous avons pris les caractéristiques de l'objectif α -plan de Zeiss.

¹⁰Olympus commercialise un objectif d'ouverture numérique $NA = 1.65$ dans un liquide d'indice 1.78.

¹¹De l'anglais : "Total Internal Reflection Fluorescence Microscopy".

¹² \vec{p}_o et \vec{p} sont respectivement les vecteurs polarisation juste avant et juste après l'objectif.

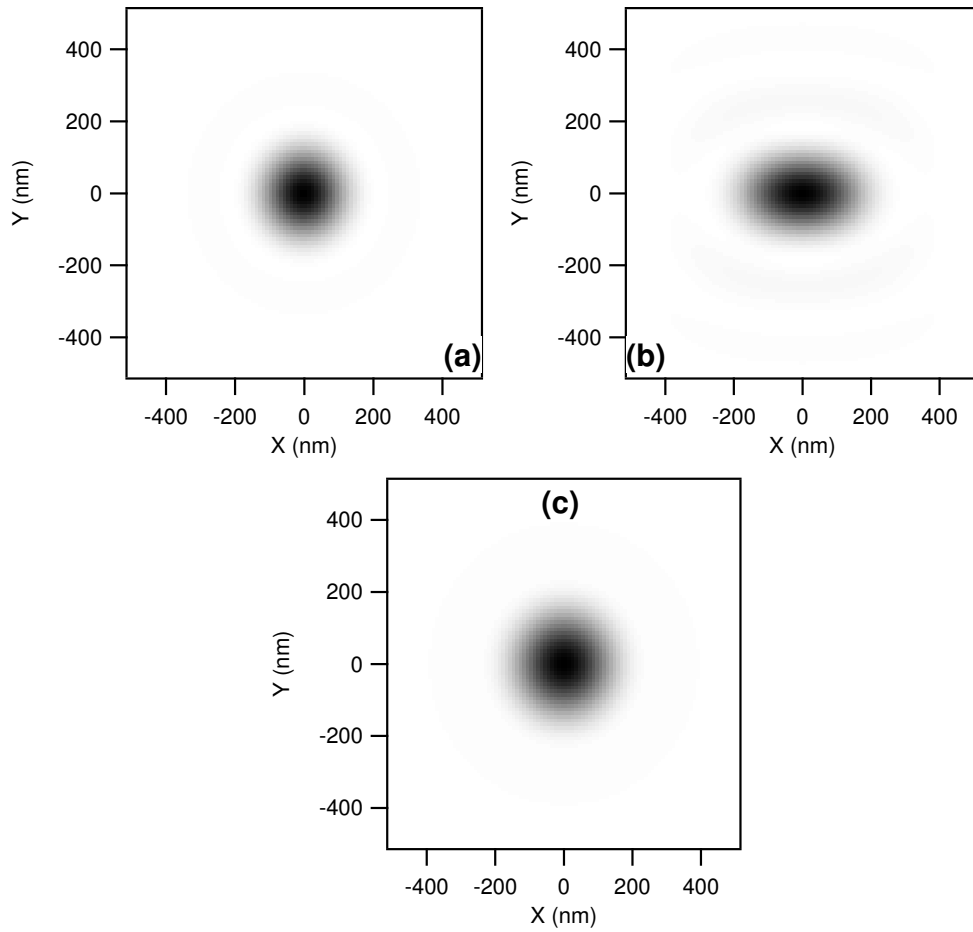


FIG. 5.5 – Géométrie de la tache de focalisation du faisceau pompe (gaussien $\beta=0.1$ et $\lambda=488\text{nm}$) dans le plan focal de l'objectif ($NA=1.45$ dans l'huile) en fonction de la polarisation : **(a)** pour un faisceau non polarisé, **(b)** pour un faisceau polarisé rectilignement selon X et **(c)** pour un faisceau polarisé circulairement.

sur la résolution axiale du système. Par contre le diamètre transverse¹³ de la tache obtenue en polarisation circulaire est compris entre le grand et le petit axe de celle obtenue en polarisation rectiligne.

$$\vec{p}_o = \frac{1}{\sqrt{2}} \begin{pmatrix} \cos(\alpha) \\ \sin(\alpha) \\ 0 \end{pmatrix} + \frac{i}{\sqrt{2}} \begin{pmatrix} -\sin(\alpha) \\ \cos(\alpha) \\ 0 \end{pmatrix} = \frac{1}{\sqrt{2}} \begin{pmatrix} 1 \\ i \\ 0 \end{pmatrix} \quad (5.10)$$

¹³C'est à dire dans le plan focal.

$$\vec{p} = \frac{1}{\sqrt{1+\cos^2\theta}} \begin{pmatrix} \cos(\theta) \\ i \cos(\theta) \\ -\sin(\theta) \exp(i\varphi) \end{pmatrix} \quad (5.11)$$

Influence de l'ouverture numérique de l'objectif

Les formules de Rayleigh (5.2) ou de Abbe (5.1) montrent que la résolution latérale est inversement proportionnelle à l'ouverture numérique de l'objectif. Les figures 5.7 et 5.8 décrivent l'influence de l'ouverture numérique sur la focalisation d'un faisceau polarisé rectilignement. Nous pouvons constater que les effets sont différents dans les trois directions de l'espace :

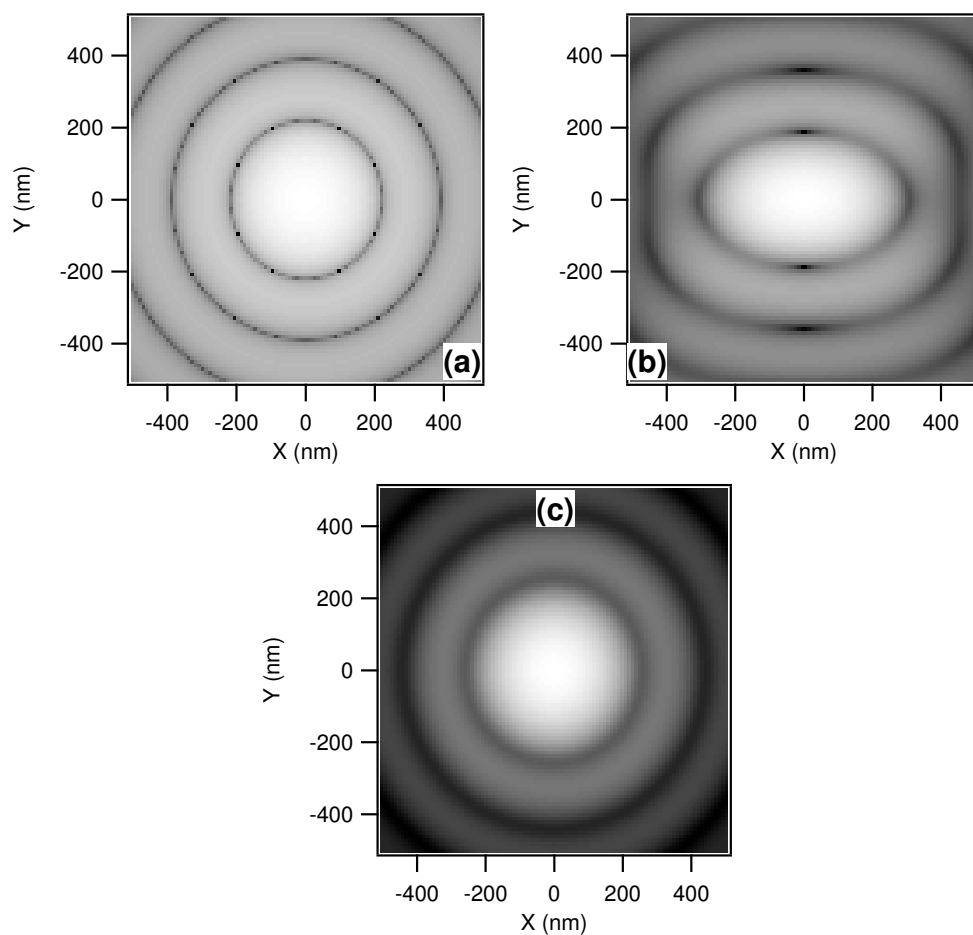


FIG. 5.6 – Cartes d'intensité de la figure 5.5 en échelle logarithmique.

- Perpendiculairement à la polarisation (ici en Y) la résolution (dy) évolue en $1/NA$; la fonction $dy(NA) = \frac{0.8\lambda}{2NA}$ s'ajuste parfaitement sur la courbe de la figure 5.8.
- Le long de l'axe optique (en Z) la résolution (dz) semble être en $1/NA^2$. La fonction qui s'ajuste le mieux est $dz(NA) = \frac{4.88\lambda}{2NA^2} - \frac{1.14\lambda}{2NA}$.
- Par contre dans la direction de polarisation, aucune fonction simple ne semble correspondre à la courbe. Nous pouvons quand même constater que la résolution ($dx(NA)$) évolue moins rapidement que dans les autres directions.

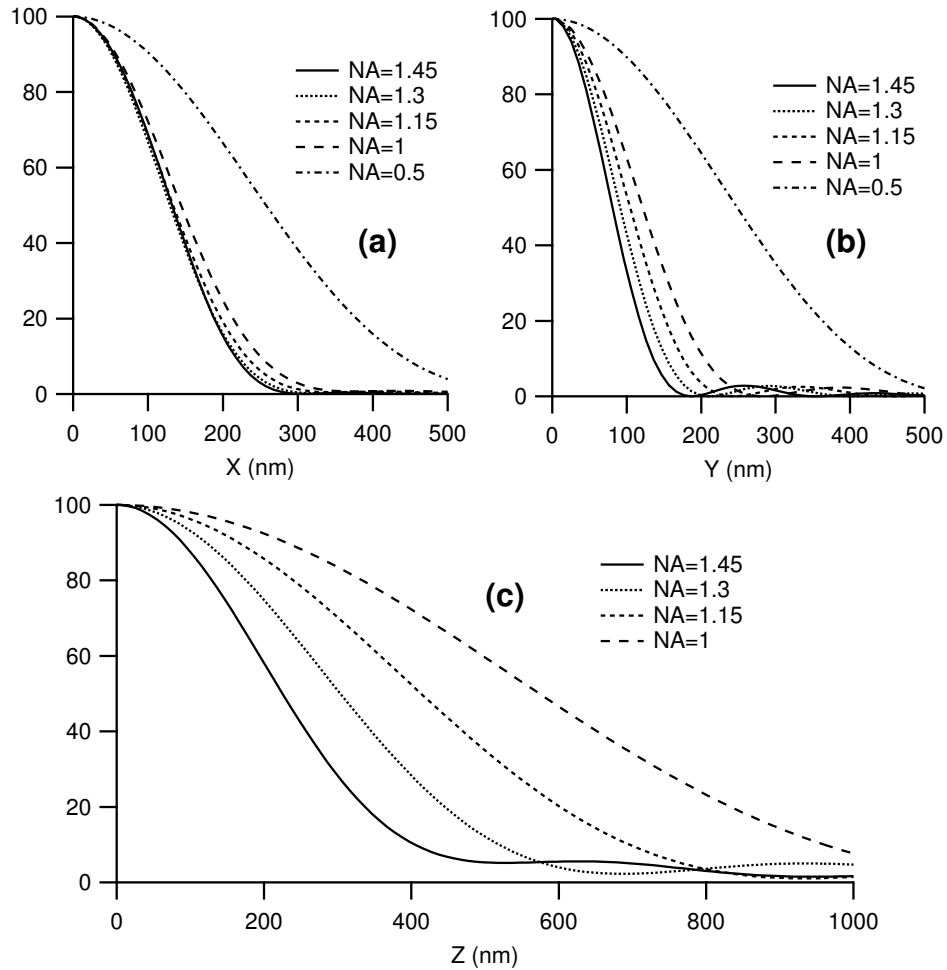


FIG. 5.7 – Influence de l'ouverture numérique sur la résolution le long des trois axes. Le faisceau est gaussien ($\beta=0.1$ et $\lambda=488\text{nm}$) polarisé selon X.

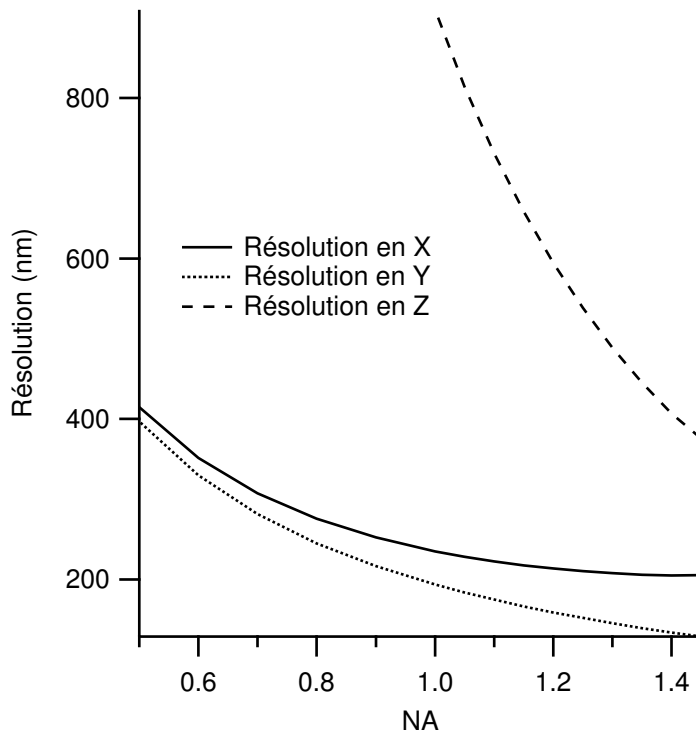


FIG. 5.8 – Résolution le long des trois axes en fonction de l'ouverture numérique de l'objectif. Le faisceau est gaussien ($\beta=0.1$ et $\lambda=488\text{nm}$) polarisé selon X.

De plus il est à remarquer que les effets de la polarisation, comme par exemple la dissymétrie de la tache de focalisation, s'estompent pour de faibles ouvertures numériques.

Influence de la forme du faisceau incident

Nous utilisons des faisceaux gaussiens dans nos calculs parce que le mode fondamental gaussien TEM00 est le plus courant dans les Lasers. Cependant ce n'est pas la forme de faisceau qui donne les meilleures résolutions [81–84]. Dans ce paragraphe nous allons envisager d'utiliser d'autres types de faisceaux bien que cela pose de véritables problèmes expérimentaux. Avant tout il est possible de changer la taille du faisceau gaussien à l'aide d'un élargisseur¹⁴ de faisceau [76]. La largeur à mi-hauteur de la gaussienne

¹⁴Un élargisseur est un système afocal comme par exemple une lunette de Galilée.

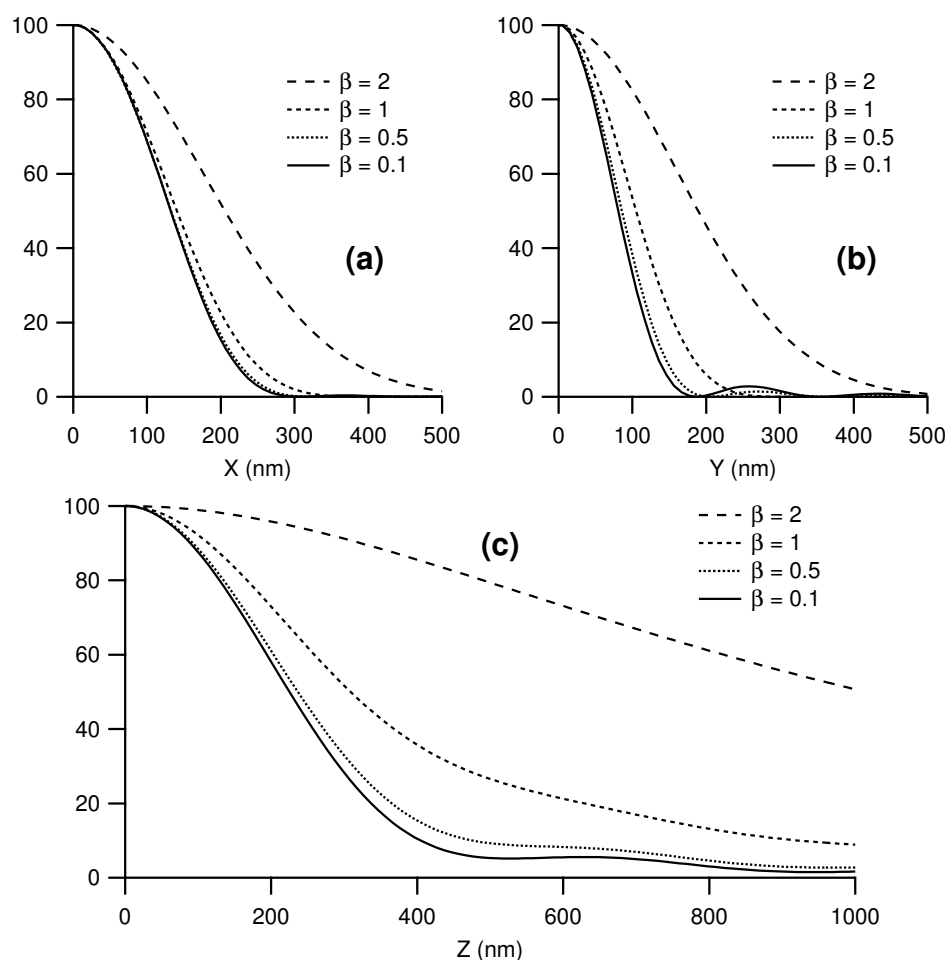


FIG. 5.9 – Influence de la largeur de la gaussienne (par rapport au diamètre de l'objectif) sur la résolution le long des trois axes. Le faisceau est gaussien ($\lambda=488\text{nm}$) polarisé selon X et l'objectif est à très forte ouverture numérique ($NA=1.45$ dans l'huile).

ainsi obtenue doit être comparée au diamètre d'entrée de l'objectif [74]. Rappelons que nous avons déjà introduit la variable β qui est le rapport du rayon de l'objectif sur la largeur de la gaussienne. La figure 5.9 montre qu'une augmentation de la largeur de la gaussienne par rapport au diamètre de l'objectif ($\beta \searrow$), tend à réduire les dimensions de la tache de focalisation¹⁵. En fait à partir d'une certaine valeur ($\beta \approx 0.1$) les dimensions de la tache n'évoluent

¹⁵Ce résultat est intuitif puisque la transformée de Fourier d'une gaussienne large est une gaussienne étroite.

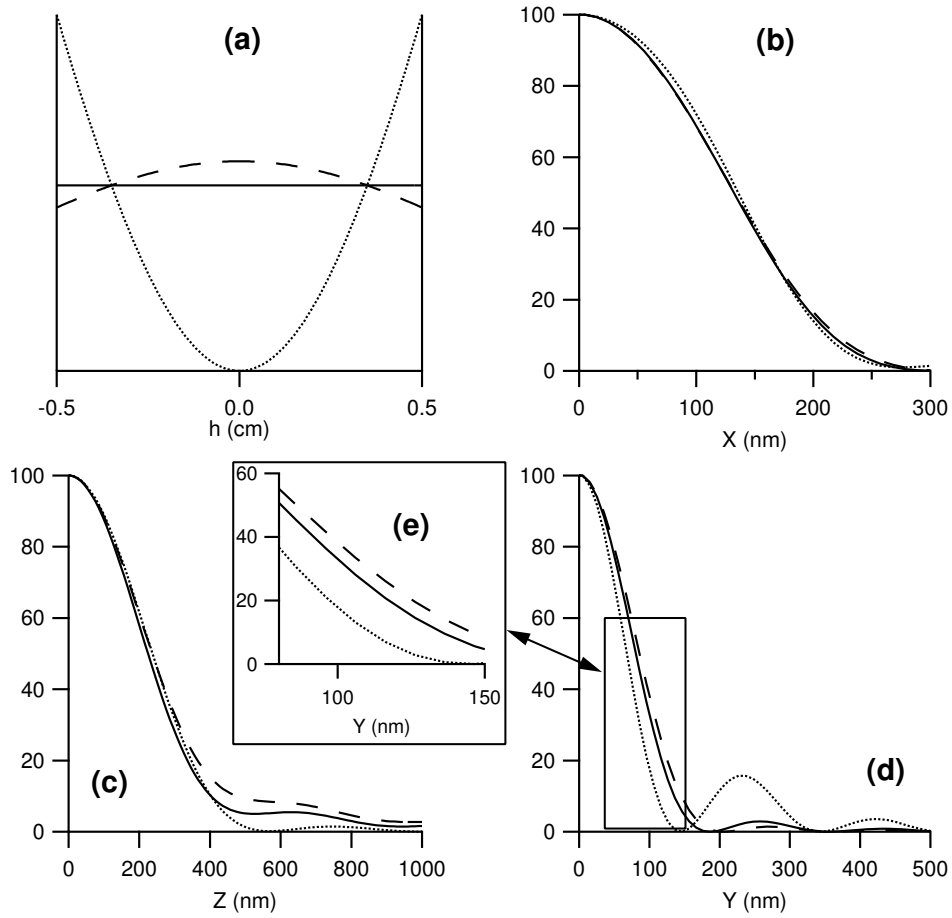


FIG. 5.10 – Influence de la forme du faisceau sur la résolution le long des trois axes. Le faisceau ($\lambda=488\text{nm}$) est polarisé selon X et l'objectif est à très forte ouverture numérique ($NA=1.45$ dans l'huile). La figure (a) représente l'amplitude des faisceaux en entrée de l'objectif. Les courbes continues correspondent à un champ uniforme, celles en pointillés au champ d'amplitude (5.12) et celles en tirets à un faisceau gaussien ($\beta=0.5$).

quasiment plus ; le cas limite $\beta=0$ correspond à un faisceau ayant une intensité uniformément répartie¹⁶. Sur la figure 5.10 (a) la courbe en pointillés représente l'amplitude d'un champ de la forme :

$$E_p \propto 1 - \exp \left[- \left(\frac{n\beta \sin \theta}{NA} \right)^2 \right] \quad (5.12)$$

¹⁶Cf. courbe continue de la figure 5.10 (a).

avec $\beta=0.5$. La figure (e) montre qu'avec un tel faisceau la résolution est améliorée de 23% dans la direction orthogonale à la polarisation sans diminuer dans les autres directions.

5.1.3.3 Calcul de la CEF

La fonction d'efficacité de collection est une carte d'intensité en trois dimensions qui représente l'énergie que reçoit le détecteur (placé derrière le trou confocal (cf. fig. 5.2)) en fonction de la position de la source ponctuelle. Nous noterons cette fonction $CEF(x,y,z)$. Dans le chapitre précédent (4.3.2), nous avons vu comment calculer rigoureusement le champ $\vec{E}(\vec{F}_lM, \vec{p}, \vec{pos})$, émis par un fluorophore, assimilé à un dipôle, situé au voisinage du foyer de l'objectif (dans l'espace objet), en un point M de l'espace image¹⁷. Le signal détecté par la photodiode (à travers le trou) est donc égal à :

$$I(\vec{p}, \vec{pos}) = \iint_S \left[\vec{E}(\vec{F}_lM, \vec{p}, \vec{pos}) \cdot \vec{E}^*(\vec{F}_lM, \vec{p}, \vec{pos}) \right] dF_lM \quad (5.13)$$

avec \vec{E}^* le complexe conjugué de \vec{E} , S la surface du trou confocal et M un point de cette surface. Dans ce chapitre, nous considérerons que les molécules ont une vitesse de rotation importante comparée au temps d'intégration de la photodiode, de telle façon que pendant le temps d'intégration le dipôle ait pris toutes les orientations. Dans ce cas¹⁸ :

$$CEF_\lambda(\vec{pos}) = \oint\!\!\!\oint I(\vec{p}, \vec{pos}) d\vec{p} \quad (5.14)$$

La plus part du temps, le spectre d'émission d'un fluorophore peut être considéré comme gaussien de largeur égale à quelques dizaines de nanomètres. Dans la suite, nous considérerons donc parfois que la fluorescence est monochromatique, dans le cas contraire :

$$CEF(\vec{pos}) = \int_\lambda CEF_\lambda(\vec{pos}) \exp\left[-\left(\frac{\lambda - \lambda_0}{\Delta\lambda}\right)^2\right] d\lambda \quad (5.15)$$

Ce volume est en quelque sorte l'image en trois dimensions du trou confocal à travers le microscope. Nous comprenons donc que les dimensions de la CEF sont liées au diamètre du trou. Pour avoir la meilleure résolution, il est donc

¹⁷ F_l est le foyer de la lentille de tube, \vec{p} le vecteur orientation du dipôle et $\vec{pos} = (x, y, z)$ le vecteur position du dipôle.

¹⁸Il est à remarquer que la surface fermée d'intégration est une sphère.

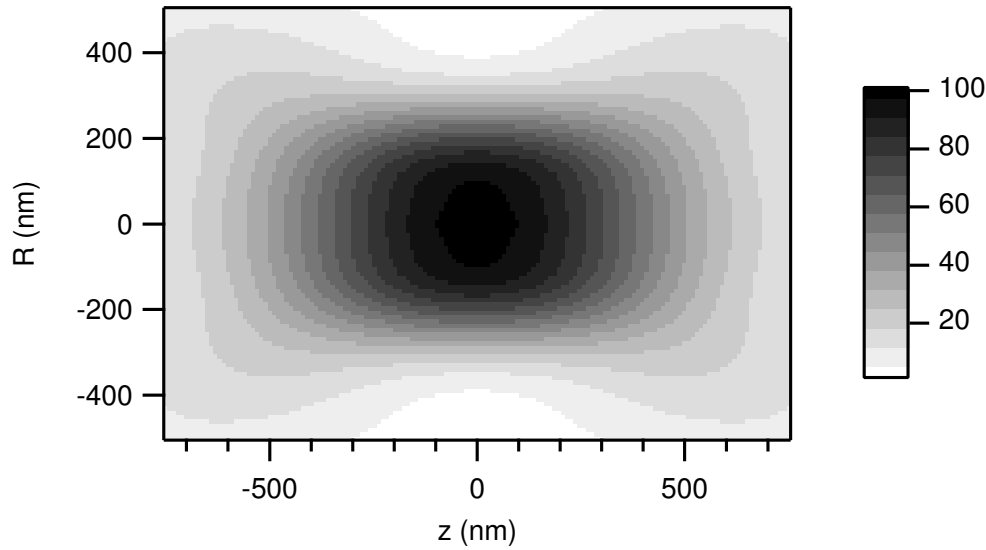


FIG. 5.11 – Coupe longitudinale du volume d'efficacité de collection d'un microscope de grossissement $\times 40$ avec un objectif d'ouverture numérique $NA=1.3$ dans l'huile, à travers un trou de $20\mu\text{m}$ de diamètre. La fluorescence est considérée comme monochromatique ($\lambda=525\text{nm}$).

nécessaire de travailler avec un trou le plus petit possible. Cependant au-delà d'une certaine limite, le signal devient très faible ce qui implique un mauvais rapport signal à bruit. Plaçons nous dans un cas simple, le fluorophore est assimilé à un point source qui émet une onde sphérique. Lorsqu'il se situe dans le plan focal de l'objectif, nous pouvons nous placer dans l'approximation de Fresnel pour calculer son image dans le plan focal de la lentille de tube. Ce qui donne une fonction d'Airy centrée sur l'image géométrique du système (cf. fig. 5.12) :

$$Im_R(x, y) = \left[\frac{J_1 \left(\frac{k NA \sqrt{(x-mR)^2 + y^2}}{m} \right)}{\frac{k NA \sqrt{(x-mR)^2 + y^2}}{m}} \right]^2 \quad (5.16)$$

avec m le grossissement du microscope et R le déplacement le long de l'axe X (dans le plan focal) du fluorophore. La tache centrale de cette fonction d'Airy a un diamètre :

$$\Phi = \frac{1.22m\lambda}{NA} \quad (5.17)$$

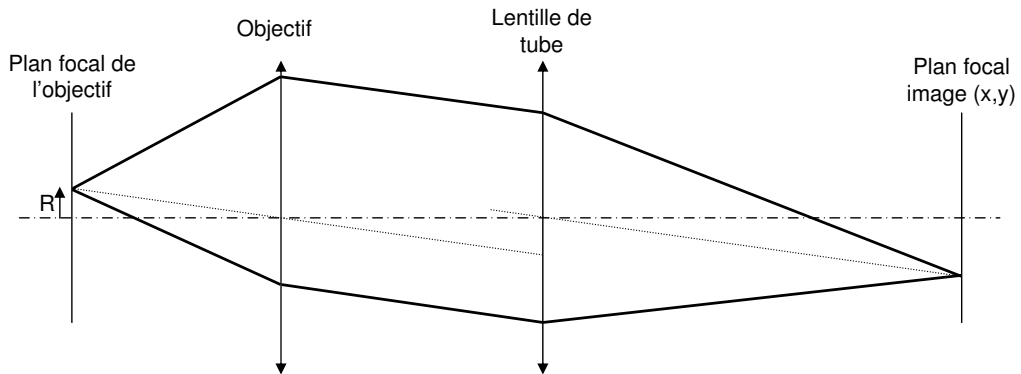


FIG. 5.12 – Représentation géométrique de l'imagerie de fluorescence dans un microscope.

Nous estimons donc que pour conserver un rapport signal à bruit correct, le diamètre du trou confocal ne doit pas être inférieur à Φ . Dans l'exemple de la figure 5.11, le sténopé a un diamètre de 20 microns tandis que $\Phi = 19.7\mu m$, c'est donc un cas limite. Ce calcul scalaire, faisant les hypothèses de l'approximation de Fresnel, nous permet de faire une étude rapide de la coupe transverse (dans le plan focal) de la CEF en fonction des différents paramètres. En effet, si S est la surface du sténopé :

$$CEF(R) = \iint_S I m_R(x, y) \, dx dy . \quad (5.18)$$

La figure 5.13 montre que l'approximation de Fresnel suffit pour calculer la CEF dans le plan focal. Cependant, la plus part du temps, c'est la dimension selon l'axe Z qui est la plus importante puisque c'est la seule qui limite réellement le volume de détection. En effet, dans le plan focal c'est plutôt le faisceau excitateur qui est limitant dans le calcul de la MDE (Cf. fig. 5.16). Sur la figure 5.14 (a), nous pouvons constater que plus l'ouverture numérique est grande plus la pente de la CEF est forte et donc plus la fonction $CEF(R)$ ressemble à la fonction "porte". De même, le long de l'axe optique (cf. fig. 5.14 (b)), la CEF décroît d'autant plus vite que l'ouverture numérique est importante. La figure 5.15, nous montre clairement que la CEF est invariante pour un rapport ϕ/m constant, avec ϕ le diamètre du trou confocal. Finalement, pour avoir la meilleure résolution possible nous aurons donc tout intérêt à travailler avec un rapport ϕ/m le plus petit possible, en gardant à l'esprit que pour avoir un bon rapport signal à bruit, le trou doit être plus grand que

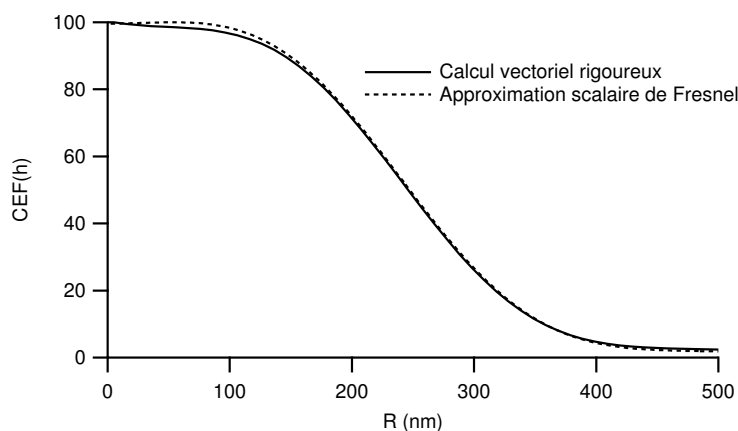


FIG. 5.13 – Comparaison de la méthode scalaire dans l'approximation de Fresnel et du calcul vectoriel rigoureux pour estimer la CEF dans le plan focal de l'objectif.

la tache centrale de la fonction d'Airy. Dans ce cas, le meilleur compromis est :

$$\frac{\phi}{m} = \frac{1.22\lambda}{NA} \quad (5.19)$$

Remarquons que comme pour l'excitation c'est l'ouverture numérique qui va limiter la résolution du système.

5.1.3.4 Calcul de la MDE

Nous avons vu, dans les chapitres précédents, que le volume d'efficacité de détection (MDE) est le résultat du produit du volume d'efficacité d'excitation (EEF) par celui de collection (CEF). Plus ce volume sera petit, meilleure sera la résolution du microscope. Or sur la figure 5.17 (c), nous pouvons constater que ce volume à des dimensions très différentes selon les directions. Pour un faisceau excitateur polarisé rectilignement, la meilleure résolution est obtenue dans la direction orthogonale à la polarisation et à l'axe optique. La résolution axiale est plus de deux fois moins bonne que les résolutions latérales¹⁹ malgré la présence d'un trou bien adapté (cf. équation (5.19)). Pour améliorer les dimensions du volume nous avons vu que nous pouvons jouer sur la forme du faisceau excitateur, sur sa polarisation et surtout sur l'ouverture numérique de l'objectif. Cependant tous ces paramètres

¹⁹Sur la figure 5.17, les résolutions sont égales à 143 nm selon Y, 194 nm selon X et 414 nm selon Z.

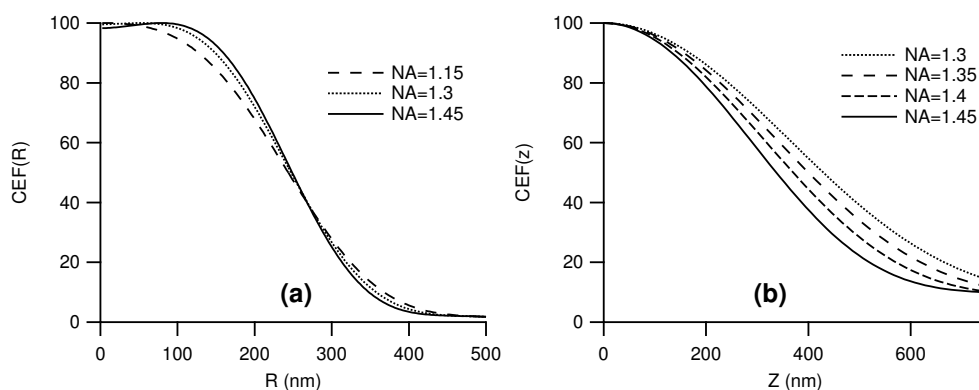


FIG. 5.14 – Influence de l'ouverture numérique de l'objectif sur la CEF. La fluorescence est considérée comme monochromatique $\lambda=525$ nm. Le grossissement du microscope est $m=40$ et le trou a un diamètre de 20 microns. La figure (a) représente la CEF dans le plan focal. La figure (b) représente la CEF le long de l'axe optique.

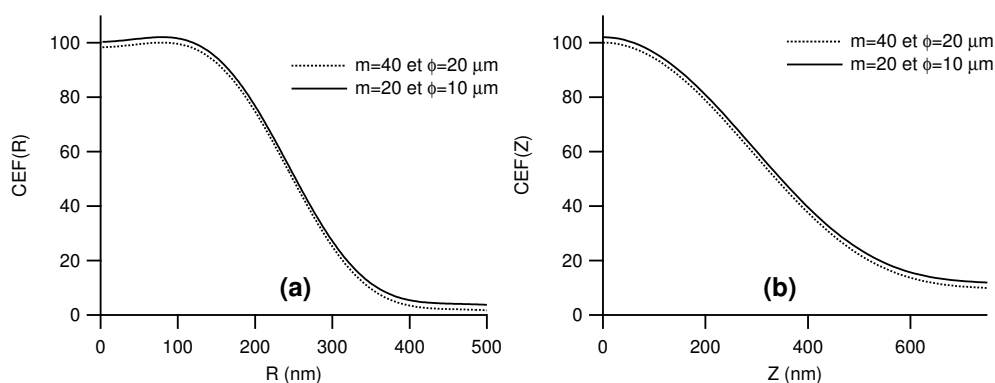


FIG. 5.15 – Influence du rapport ϕ/m sur la CEF. Les courbes continues ont été décalées vers le haut, elles sont, en fait, parfaitement confondues avec les courbes en pointillés. La fluorescence est considérée comme monochromatique $\lambda=525$ nm. L'ouverture numérique est $NA=1.45$ dans l'huile. La figure (a) représente la CEF dans le plan focal. La figure (b) représente la CEF le long de l'axe optique.

ont déjà été optimisés dans le calcul de la figure 5.17. La figure 5.16 doit nous faire remarquer que dans le plan focal, les différences de dimensions entre EEF et CEF sont telles que la MDE est proche de la EEF. La CEF par l'action du trou confocal n'a de réelle influence sur la MDE que le long de l'axe optique. Pourtant c'est le long de cet axe que la résolution est la moins bonne. C'est pourquoi, au début des années 90, Hell²⁰, Sheppard et Stelzer [16, 17] ont pensé à structurer le volume d'excitation [24, 29] et celui de collection dans ce qu'on appelle un 4π -microscope pour augmenter considérablement cette résolution axiale.

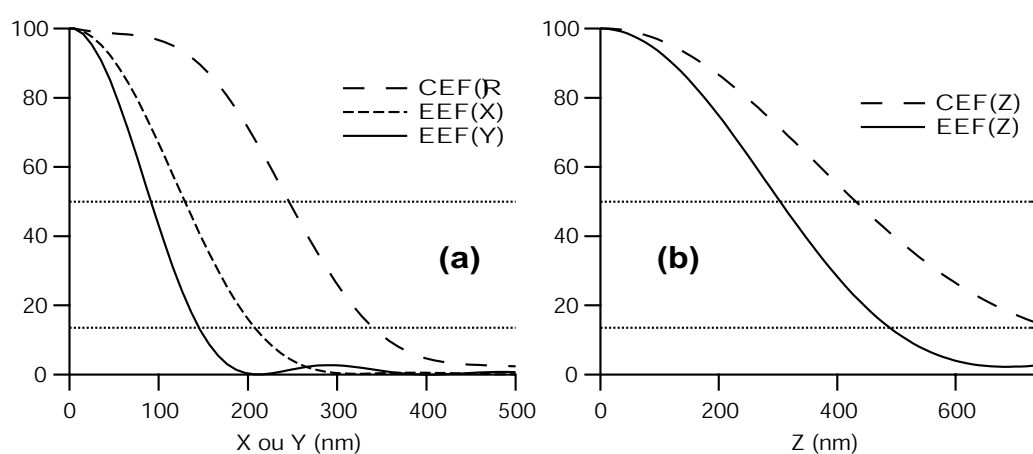


FIG. 5.16 – Comparaison de la EEF et de la CEF dans un microscope confocal à fluorescence. Le faisceau excitateur est Gaussien ($\beta = 0.1$), monochromatique ($\lambda = 488\text{nm}$) et polarisé selon X . La fluorescence est aussi considérée comme monochromatique. L'ouverture numérique de l'objectif est $NA=1.3$ dans l'huile. Le grossissement du microscope est $m=40$ et le sténopé a un diamètre de 20 microns.

5.2 4π -microscopie

Rappelons qu'un 4π -microscope est un système constitué de deux objectifs à forte ouverture numérique se faisant face de telle façon qu'ils collectent la fluorescence sur quasiment tout l'espace : 4π stéradians. Un 4π -microscope ayant une configuration classique comme celle représentée sur la figure 5.18, permet d'éclairer l'échantillon avec deux faisceaux cohérents contrapropagatifs. Les interférences entre ces deux faisceaux au niveau

²⁰European Patent EP0491289, (24-06-1992), Classification : G02B21/00M4A

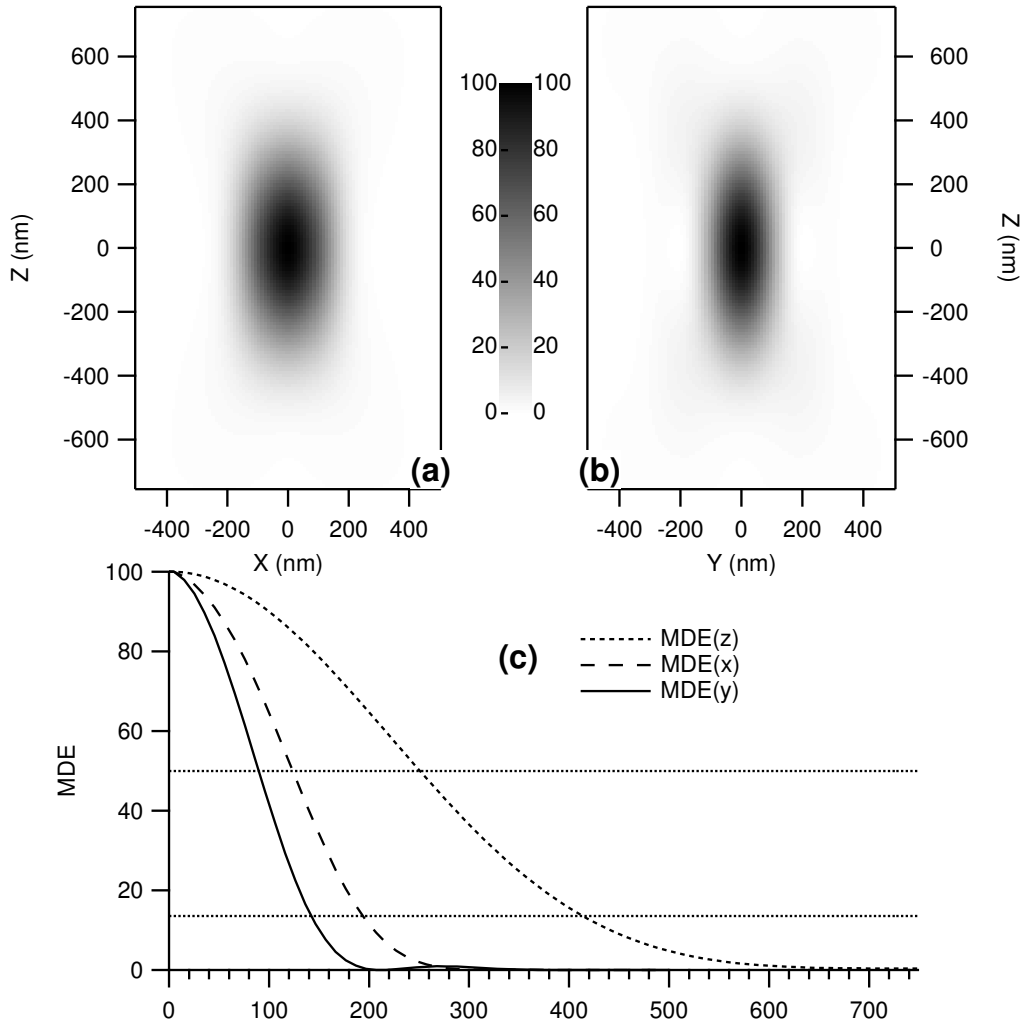


FIG. 5.17 – Volume d'efficacité de détection (MDE). Le faisceau exciteur est Gaussien ($\beta = 0.1$), monochromatique ($\lambda = 488\text{nm}$) et polarisé selon X . La fluorescence est aussi considérée comme monochromatique ($\lambda = 525\text{nm}$). L'ouverture numérique de l'objectif est $NA=1.3$ dans l'huile. Le grossissement du microscope est $m=40$ et le sténopé a un diamètre de 20 microns. (a) et (b) représentent deux coupes longitudinales du volume d'efficacité de détection, respectivement dans le plan (XOZ) et (YOZ). (c) compare les dimensions de ce volume dans les trois directions de l'espace.

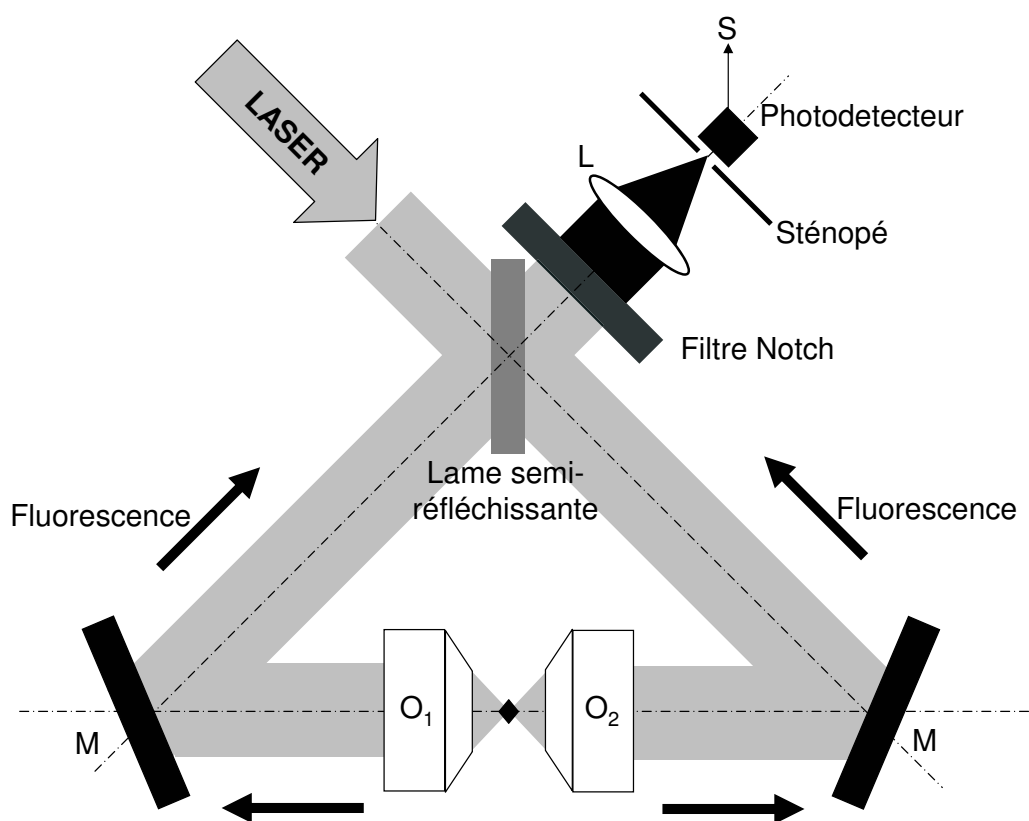


FIG. 5.18 – 4π -microscope en triangle. Deux faisceaux excitateurs issus du même Laser se propagent contrapropagativement pour interférer au niveau de l'échantillon placé au foyer commun des deux objectifs. Le filtre Notch est un coupe-bande très étroit qui permet d'arrêter le Laser. Si les deux bras sont rigoureusement de même taille, la fluorescence interfère au niveau du photodétecteur.

de l'échantillon permettent de structurer le volume d'excitation. Si les deux bras de l'interféromètre sont strictement²¹ de même longueur, le signal émis par un fluorophore unique vers la droite et celui émis (par la même molécule) vers la gauche interfèrent au niveau de la photodiode. Lorsqu'il y a des interférences à la fois sur le faisceau pompe et sur la fluorescence nous parlons de 4π -microscope de type C par opposition aux type A et type B qui respectivement ne font interférer que l'excitation ou que l'émission.

²¹La différence entre les deux chemins optiques doit être inférieure à la longueur de cohérence de la source (c'est à dire quelques microns).

5.2.1 La résolution dans un 4π -microscope de type A

5.2.1.1 Calcul de la EEF

Dans un 4π -microscope de type A, deux faisceaux contrapropagatifs mais identiques interfèrent au niveau du foyer des objectifs. En reprenant les équations du chapitre 4.3.1, nous pouvons déterminer le champ en un point²² M au voisinage de ce foyer.

$$\vec{E}(x, y, z) \propto \int_{-\pi}^{\pi} \int_0^{\theta_{max}} \vec{E}_s(\theta, \varphi) e^{ik[\sin\theta(x\cos\varphi+y\sin\varphi)]} \cos(z\cos\theta) d\Omega_{\theta,\varphi} \quad (5.20)$$

avec

$$d\Omega_{\theta,\varphi} = \sin(2\theta)d\theta d\varphi \quad (5.21)$$

et si le Laser est gaussien polarisé rectilignement selon X avant l'objectif :

$$\vec{E}_s(\theta, \varphi) \propto \sqrt{n\cos\theta} \cdot \exp\left[-\left(\frac{n\beta\sin\theta}{NA}\right)^2\right] \vec{p} \quad (5.22)$$

$$\vec{p} = \frac{\cos\theta\vec{e}_x - \sin\theta\cos\varphi\vec{e}_z}{\sqrt{1 - (\sin\theta\sin\varphi)^2}} \quad (5.23)$$

La figure 5.19 représente l'intensité du champ exprimé en (5.20). Cette intensité structurée par les interférences est constituée d'une tache centrale et de lobes secondaires. Ces lobes sont d'autant moins intenses que l'ouverture numérique de l'objectif est grande ou que le coefficient β qui définit la largeur du faisceau gaussien est petit (cf. fig. 5.20).

5.2.1.2 Calcul de la MDE

Comme pour un microscope confocal à fluorescence classique la MDE est le résultat du produit de la EEF et de la CEF. Dans le chapitre précédent nous avons calculé la EEF. Dans un 4π -microscope de type A, il n'y a pas d'interférence sur la fluorescence donc la CEF est identique à celle d'un microscope classique vue à la figure 5.11. En comparant la formule (5.6) à la (5.20) nous pouvons constater que les champs excitateurs sont les mêmes dans le plan focal d'un microscope confocal classique et dans celui d'un 4π -microscope. La résolution latérale n'est donc pas améliorée dans un 4π -microscope de type A. Par contre la tache centrale de la MDE de la figure 5.21 a une dimension²³ axiale égale à 76 nm, soit plus de 5 fois mieux que la résolution axiale

²²Nous noterons les coordonnées de ce point (x,y,z) dans le repère cartésien de centre le foyer.

²³La résolution dans une direction est la largeur de la tache mesurée à $1/e^2$ de l'intensité maximale.

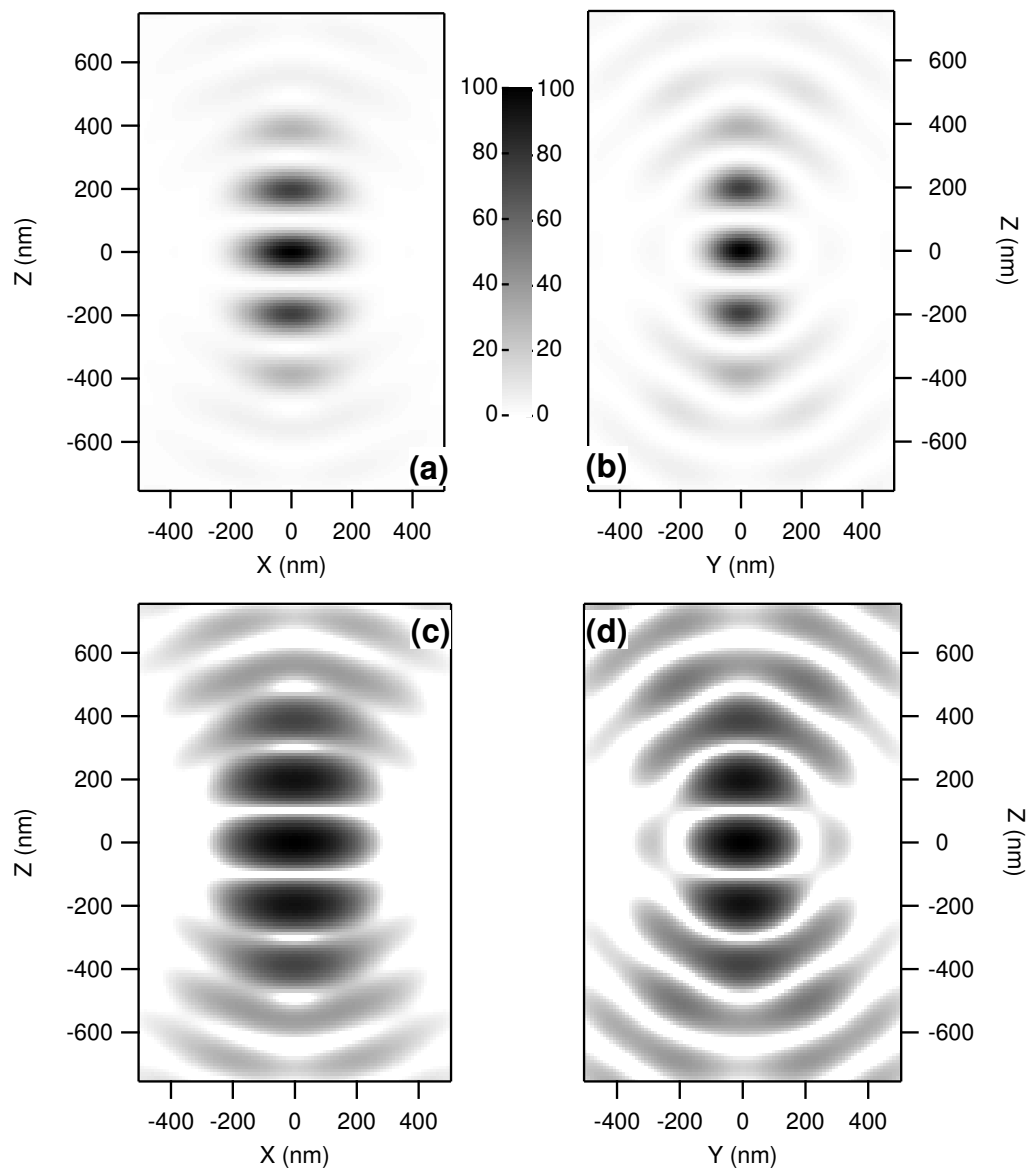


FIG. 5.19 – *EEF* d'un 4π -microscope dans le plan (XOZ) pour **(a)** et dans le plan (YOZ) pour **(b)**. Le laser est gaussien ($\lambda = 488\text{nm}$ et $\beta = 0.1$) polarisé rectilignement selon X . L'objectif est à forte ouverture numérique ($NA=1.3$ dans l'huile). Les figures **(c)** et **(d)** représentent respectivement les courbes **(a)** et **(b)** en échelle logarithmique.

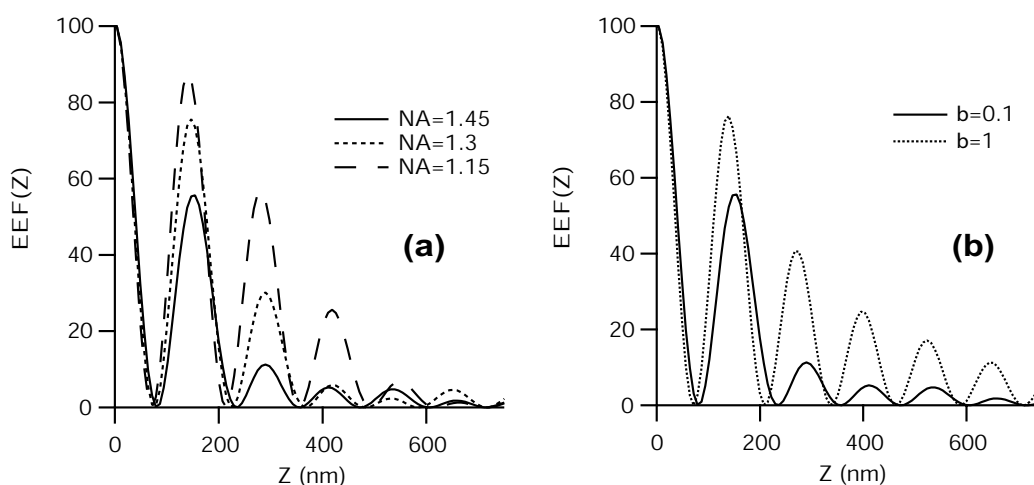


FIG. 5.20 – EEF d'un 4π -microscope le long de l'axe optique en fonction de l'ouverture numérique pour (a) ($\lambda = 488\text{nm}$ et $\beta = 0.1$) et en fonction de β pour (b) ($\lambda = 488\text{nm}$ et $NA=1.45$ dans l'huile).

d'un microscope confocal classique ayant les même caractéristiques²⁴. Il est à noter que la présence de lobes secondaire atteignant 66% du maximum d'intensité pour les premiers et près de 18% pour les seconds restreint réellement l'amélioration de la résolution axiale. De tels résultats ont été mesurés expérimentalement par Hell et al. en 1993 [85]. Ils trouvaient une tache centrale de 75 nm à mi hauteur le long de l'axe optique avec leur 4π -microscope de type A et de 520 nm avec un microscope confocal classique.

5.2.2 La résolution dans un 4π -microscope de type C

5.2.2.1 Calcul de la CEF

Lorsque les deux bras du 4π -microscope (cf. fig. 5.18) sont identiques, la fluorescence émise vers la droite et celle émise (par la même molécule) vers la gauche interfèrent au niveau de la photodiode. Nous avons vu dans le chapitre 4.3.2 que le champ en un point de l'espace image (d'un microscope classique) dépend de sa position et de son orientation dans l'espace objet (cf. équations (4.20) et (4.33)). Dans un 4π -microscope, chaque objectif voit le dipôle différemment. Dans l'exemple de la figure 5.22, le dipôle a une

²⁴La résolution axiale était de 414 nm dans les conditions décrites à la figure 5.17.

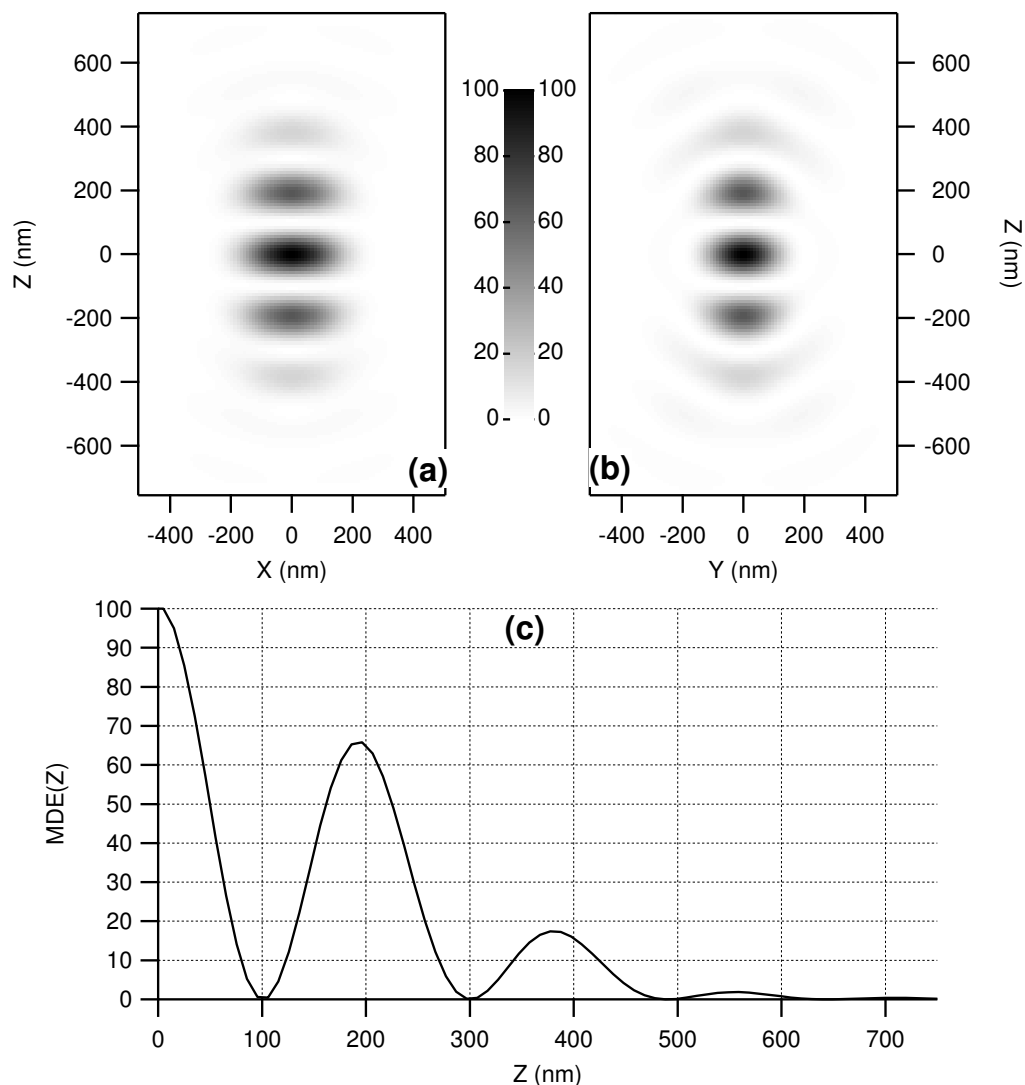


FIG. 5.21 – Volume d'efficacité de détection (MDE) d'un 4π -microscope de type A. Le faisceau exciteur est Gaussien ($\beta = 0.1$), monochromatique ($\lambda = 488\text{nm}$) et polarisé selon X . La fluorescence est aussi considérée comme monochromatique ($\lambda = 525\text{nm}$). L'ouverture numérique de l'objectif est $NA=1.3$ dans l'huile. Le grossissement du microscope est $m=40$ et le sténopé a un diamètre de 20 microns. (a) et (b) représentent deux coupes longitudinales du volume d'efficacité de détection, respectivement dans le plan (XOZ) et (YOZ). (c) représente la MDE le long de l'axe optique.

orientation \vec{p} et \vec{pos} pour l'objectif 1 mais \vec{p}_2 et \vec{pos}_2 pour l'objectif 2, avec :

$$\vec{p}_2 = \begin{pmatrix} \left(\vec{p} \cdot \vec{e}_x \right) \\ \left(\vec{p} \cdot \vec{e}_y \right) \\ - \left(\vec{p} \cdot \vec{e}_z \right) \end{pmatrix} \quad (5.24)$$

$$\vec{pos}_2 = \begin{pmatrix} \left(\vec{pos} \cdot \vec{e}_x \right) \\ \left(\vec{pos} \cdot \vec{e}_y \right) \\ - \left(\vec{pos} \cdot \vec{e}_z \right) \end{pmatrix} \quad (5.25)$$

Finalement ce 4π -microscope constitué de deux objectifs pour observer un fluorophore est équivalent à un microscope à un seul objectif qui regarderait deux dipôles cohérents entre eux et symétriques par rapport au plan focal. En tout point M du photodétecteur, le champ s'exprime comme la somme

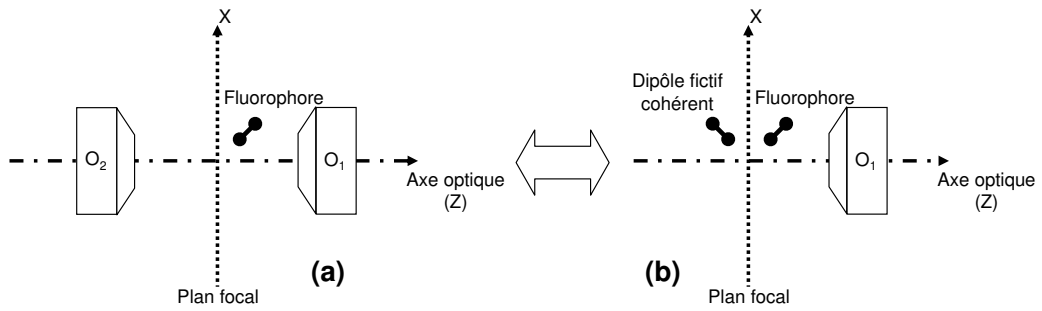


FIG. 5.22 – (a) représente un fluorophore dans le plan d'observation des deux objectifs d'un 4π -microscope. En (b) deux fluorophores cohérents et symétriques par rapport au plan focal (en orientation et en position) sont observés par un objectif. Les montages (a) et (b) sont équivalents du point de vue de l'émission.

de deux champs calculés avec la formule (4.33).

$$\vec{E}(\vec{F}_l M, \vec{p}, \vec{pos}) = \vec{E}_1(\vec{F}_l M, \vec{p}, \vec{pos}) + \vec{E}_2(\vec{F}_l M, \vec{p}_2, \vec{pos}_2) \quad (5.26)$$

Dans ce cas, l'intensité détectée par la photodiode à travers le trou confocal de surface S est :

$$I(\vec{p}, \vec{pos}) = \iint_S \left[\vec{E}(\vec{F}_l M, \vec{p}, \vec{pos}) \cdot \vec{E}^*(\vec{F}_l M, \vec{p}, \vec{pos}) \right] dF_l M \quad (5.27)$$

et le volume de collection est décrit par la fonction :

$$CEF(\vec{pos}) = \int_{\lambda} \left\{ \iint I(\vec{p}, \vec{pos}) d\vec{p} \right\} Spectre(\lambda) d\lambda \quad (5.28)$$

En faisant l'approximation scalaire décrite dans le chapitre 5.1.3.3, nous pouvons prévoir la forme de la CEF dans le plan focal mais aussi le long de l'axe optique. Lorsque la source se trouve dans le plan focal, son image au niveau du détecteur est une fonction d'Airy centrée sur son image géométrique. La fonction de collection est donc la même que pour un microscope confocal classique (cf. chap. 5.1.3.3). Par contre, lorsque la source se déplace le long de l'axe optique, deux ondes sphériques interfèrent au niveau de la photodiode, l'une est convergente, l'autre est divergente de tel sorte qu'elles sont symétriques par rapport au plan focal image de la lentille de tube. Le résultat est un signal oscillant en fonction de la position de la source.

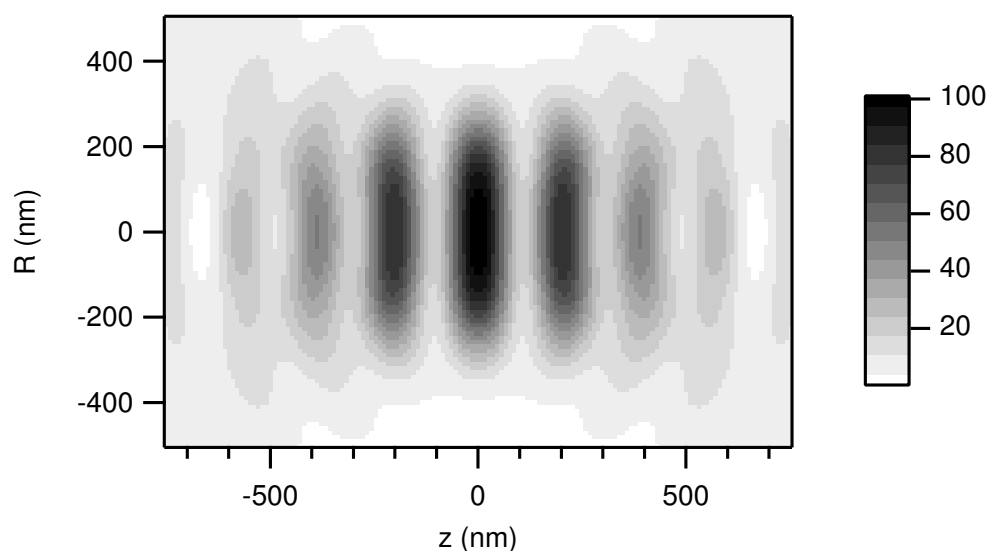


FIG. 5.23 – Coupe longitudinale du volume d'efficacité de collection d'un 4π -microscope (de type B ou C) de grossissement $\times 40$ avec un objectif d'ouverture numérique $NA=1.3$ dans l'huile, à travers un trou de $20\mu\text{m}$ de diamètre. La fluorescence est considérée comme monochromatique ($\lambda=525\text{nm}$).

Néanmoins pour connaître précisément la totalité du volume d'efficacité de collection d'un 4π -microscope de type B ou C, nous devons résoudre l'équation (5.28). Le résultat est représenté à la figure 5.23. Il est comparable à celui de la figure 5.11 avec une structure longitudinale provenant des interférences décrites précédemment entre des ondes convergentes et divergentes.

5.2.2.2 Discussion sur la 4π -microscopie de type B

Dans un 4π -microscope de type B [86], il n'y a pas d'interférence sur le faisceau excitateur au niveau de l'échantillon. Pour construire un tel microscope le plus simple est de remplacer la lame semi-réfléchissante de la figure 5.18 par une lame complètement transparente pour le faisceau Laser. Dans ce cas, le volume d'efficacité d'excitation est comparable à celui d'un microscope ayant un seul objectif. La figure 5.24 représente la MDE résultat du produit de la EEF non structurée de la figure 5.4 et de la CEF 5.23. Il est à noter qu'il est beaucoup plus difficile d'obtenir des interférences avec la fluorescence (au niveau de la photodiode), qu'avec un faisceau d'excitation quasiment monochromatique comme un Laser (au voisinage de l'échantillon). En effet, les deux bras d'un 4π -microscope de type B ou C doivent être ri-

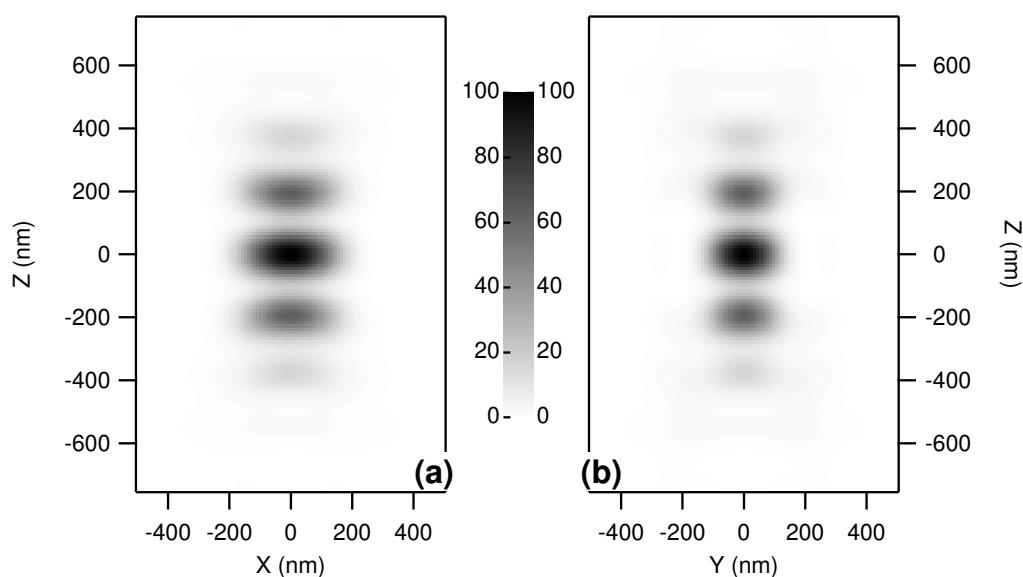


FIG. 5.24 – Coupes longitudinales du volume d'efficacité de détection d'un 4π -microscope de type B de grossissement $\times 40$ avec un objectif d'ouverture numérique $NA=1.3$ dans l'huile, à travers un trou de $20\mu\text{m}$ de diamètre. La fluorescence est considérée comme monochromatique ($\lambda=525\text{nm}$). Le faisceau pompe est un Laser ($\lambda=488\text{nm}$) gaussien ($\beta=0.1$) polarisé rectilignement selon X. (a) représente la coupe dans le plan (XoZ). (b) représente la coupe dans le plan (YoZ).

goureusement de même longueur²⁵ (optique) car la longueur de cohérence de la fluorescence est de l'ordre de la dizaine de microns. Le 4π -microscope de type B semble donc cumuler tous les désavantages. Il donne de moins bons résultats qu'un 4π -microscope de type C (cf. chapitre 5.2.2.3) ou même qu'un 4π -microscope de type A. Par contre il est tout aussi complexe à construire qu'un 4π -microscope de type C et donc beaucoup plus qu'un 4π -microscope de type A. Cependant nous verrons dans le paragraphe 5.3.6 qu'un tel microscope est réellement utile pour observer des échantillons bioluminescents.

5.2.2.3 Calcul de la MDE

Dans un 4π -microscope de type C, les volumes d'excitation et de collection sont structurés respectivement par les interférences sur les faisceaux pompes autour de l'échantillon et par les interférences sur la fluorescence au niveau du détecteur. L'efficacité de détection d'un 4π -microscope de type C, résultat du produit de la EEF 5.19 et de la CEF 5.23, est décrite par la figure 5.25. Sur cette figure, nous pouvons remarquer que le diamètre axial de la tache centrale atteint 65 nm (à $1/e^2$) cependant la résolution du système reste limitée par les lobes secondaires qui atteignent 63% du maximum de la tache centrale. Remarquons que de tels résultats ont été mesurés dans l'équipe de S. W. Hell en utilisant des échantillons formés d'une très fine couche de luminophores [46]. La présence de lobes secondaires est très gênante pour observer directement les échantillons puisqu'ils créent un phénomène de dédoublement de l'image. La solution est de déconvoluer l'image par la fonction d'efficacité de détection (MDE) [87, 88]. De toute façon, il est toujours conseillé de déconvoluer les images pour améliorer leur résolution quel que soit le type de microscope utilisé. Néanmoins la déconvolution reste limitée par la complexité des algorithmes [89], il est donc très important d'arriver à réduire les lobes secondaires. Plusieurs méthodes ont été proposées. Certains ont envisagé de modifier la forme du faisceau excitateur [90, 91] en appliquant les concepts de Toraldo di Francia [81, 82] à la 4π -microscopie. Cette technique complexifie encore la forme du 4π -microscope, or ce microscope est peut être déjà trop complexe pour une utilisation courante dans des laboratoires de biologie. Une idée plus simple a été exposée par J. Bewersdorf au congrès "Focus On Microscopy" en 2005 à Jena (Allemagne). Il préconisait d'utiliser des fluorophores émettant dans le rouge de sorte que les lobes secondaires de la EEF tombent sur les minima de la CEF. Le résultat représenté à la figure 5.26 montre que les lobes secondaires ne dépassent pratiquement plus 20% du maximum de la tache centrale. Malheureusement

²⁵Or ces bras mesurent généralement plusieurs dizaines de centimètres.

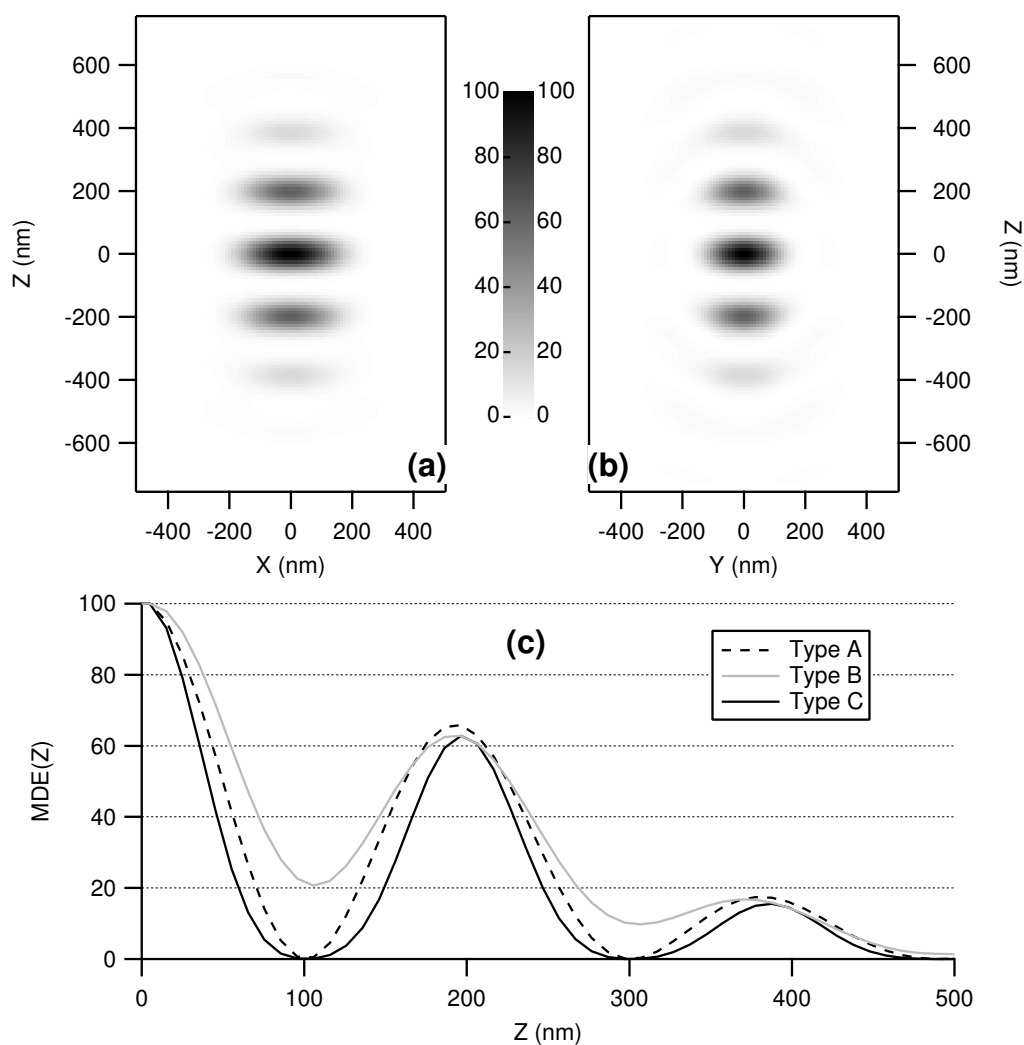


FIG. 5.25 – Coupes longitudinales du volume d'efficacité de détection d'un 4π -microscope de type C de grossissement $\times 40$ avec un objectif d'ouverture numérique $NA=1.3$ dans l'huile, à travers un trou de $20\mu\text{m}$ de diamètre. La fluorescence est considérée comme monochromatique ($\lambda=525\text{nm}$). Le faisceau pompe est un Laser ($\lambda=488\text{nm}$) gaussien ($\beta=0.1$) polarisé rectilignement selon X . (a) représente la coupe dans le plan (XoZ). (b) représente la coupe dans le plan (YoZ). (c) est une comparaison des résolutions axiales des trois types de 4π -microscope.

ce résultat intéressant est limité à un type de fluorophores. Il ne peut donc pas être utilisé pour observer de nombreux phénomènes biologiques qui nécessitent d'utiliser d'autres fluorophores. C'est pourquoi, jusqu'à présent, la solution utilisée (par exemple dans le 4π -microscope commercial de Leica) est l'excitation à deux photons [92].

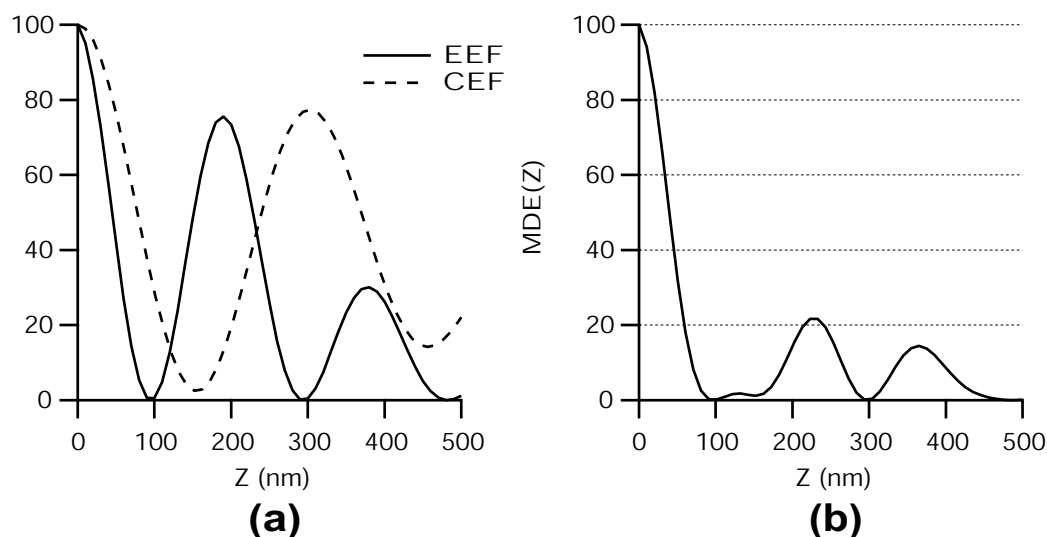


FIG. 5.26 – *EEF*, *CEF* ((a)) et *MDE* ((b)) le long de l'axe optique d'un 4π -microscope de type C. La fluorescence est décalée dans le rouge ($\lambda=775\text{nm}$) de façon à atténuer la hauteur des lobes secondaires. Le laser est gaussien ($\lambda=488\text{nm}$ et $\beta=0.1$) polarisé rectilignement selon X. $NA=1.3$ dans l'huile et $m=40$. Le diamètre du trou confocal est de 20 microns.

5.2.3 4π -microscopie à deux photons

Nous avons vu sur le diagramme de Jablonski de la figure 5.1 que l'excitation d'un fluorophore peut être obtenue par l'absorption simultanée de deux photons de faible énergie. Dans ce cas, l'efficacité d'excitation n'est plus proportionnelle à l'intensité du faisceau excitateur mais au carré de cette intensité. Cette méthode nécessite l'utilisation d'un Laser pulsé pour accroître la probabilité d'absorption. La plupart des fluorophores utilisés en Biologie cellulaire ont un spectre d'absorption (à un photon) dans le visible. En microscopie à deux photons les faisceaux excitateurs émettent donc dans l'infrarouge proche. Gugel et al. [92] utilisent, par exemple, un fluorophore appelé "Oregon Green", excité à 488nm dans le régime à un photon et à

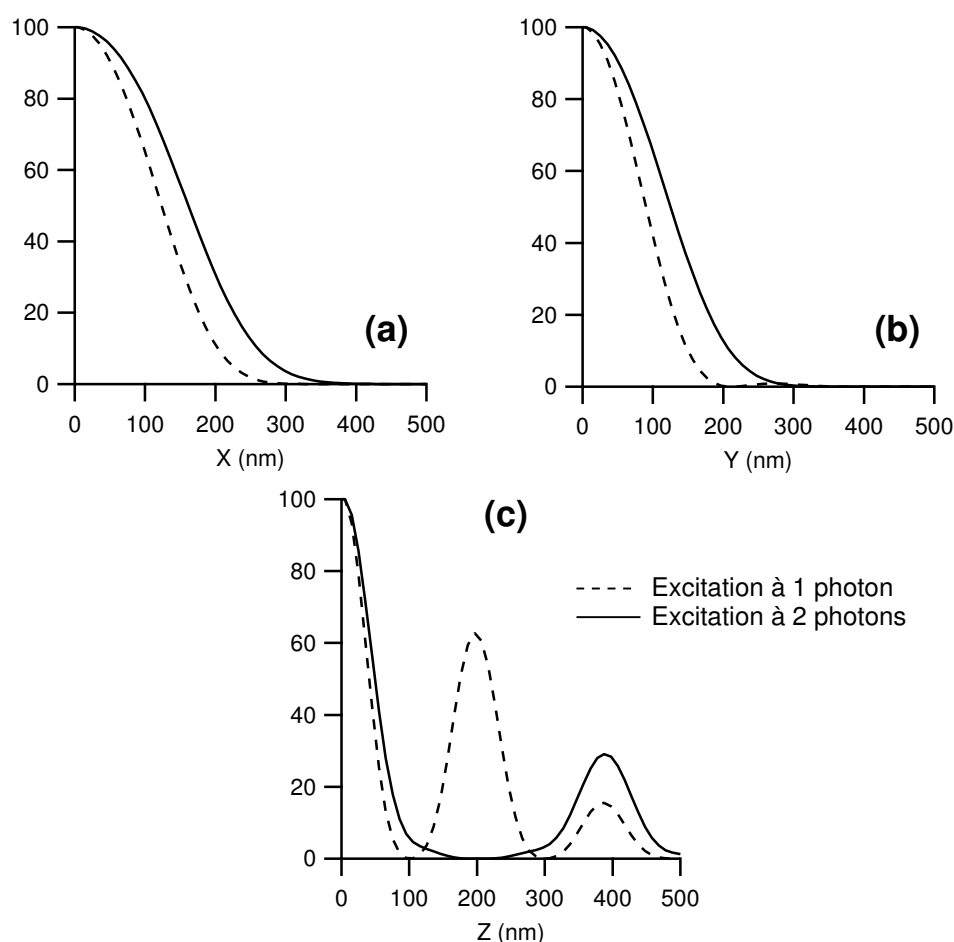


FIG. 5.27 – Comparaison des résolutions en 4π -microscopie à 1 et 2 photons le long des trois axes. Les Lasers sont gaussiens ($\beta=0.1$), polarisés rectilignement selon X . La longueur d'onde d'absorption à 1 photon est $\lambda = 488\text{nm}$, celle à 2 photons est $\lambda = 2 \times 488\text{nm}$. $NA=1.3$, $m=40$ et le trou confocal a un diamètre de 20 microns. La fluorescence est considérée comme monochromatique ($\lambda=525\text{nm}$).

880nm dans celui à deux photons. L'utilisation de longueurs d'onde dans l'infrarouge a des avantages, par exemple, sur la pénétration des photons dans les tissus biologiques [6]. Elle a aussi des inconvénients, notamment sur la résolution. En effet, bien que l'efficacité d'excitation soit proportionnelle au carré de l'excitation, la résolution est moins bonne qu'en microscopie à un photon [7]. Néanmoins dès 1992, Hell et Stelzer [93] ont montré qu'une

telle excitation à deux photons améliore considérablement la résolution axiale d'un 4π -microscope puisque elle permet d'atténuer les lobes secondaires. La figure 5.27 compare les résolutions d'un 4π -microscope de type C, le long des trois axes, selon qu'il fonctionne dans le régime d'absorption à un photon ou à deux photons [94]. Nous constatons clairement que les lobes secondaires sont atténués puisqu'ils n'atteignent plus que 29% du maximum (contre 63% dans le cas de l'absorption à un photon), malheureusement la tache centrale est plus large dans toutes les directions. Les rayons de cette tache sont respectivement égaux à 246nm (contre 193nm dans le cas de l'absorption à un photon), 198nm (contre 142nm) et 82nm selon les axes X, Y et Z. La résolution latérale est donc de 27 à 40% moins bonne à deux photons qu'à un photon. Dans le chapitre suivant nous présentons donc une nouvelle technique qui permet d'améliorer cette résolution latérale.

5.3 4π -microscope modifié

Dans ce chapitre nous allons présenter une technique qui permet d'augmenter la résolution latérale d'un 4π -microscope tout en conservant les nombreux avantages d'un tel microscope, voire en les améliorant légèrement [95]. Pour ce faire, nous proposons une méthode qui réduit le volume d'efficacité de collection. A priori très peu de travaux ont été menés sur l'étude de la CEF alors que de nombreuses techniques²⁶ ont été utilisées pour améliorer la EEF. De plus contrairement à bon nombre de ces techniques, notre méthode est indépendante de la longueur d'onde des sources, ce qui est important puisque les fluorophores ont des spectres relativement larges. Enfin cette méthode simple s'appuie sur un 4π -microscope existant et commercialisé par Leica [92, 96], une expérience peut donc être réalisée "facilement" par les laboratoires qui possèdent un tel microscope.

5.3.1 Description de la méthode

La méthode consiste à réduire la cohérence spatiale des signaux de fluorescence collectés par chacun des deux objectifs [95, 96]. Dans un 4π -microscope "classique", nous avons vu que les images respectives du fluorophore, faites par chacun des bras du 4π -microscope, sont symétrique par rapport au plan focal de la lentille de tube. Ainsi lorsque la source est dans le plan focal des objectifs les images sont confondues dans le plan du détecteur. Dans notre système représenté à la figure 5.29, nous retournons l'une de ces

²⁶Filtre de phase, polarisation du faisceau d'excitation, STED ...

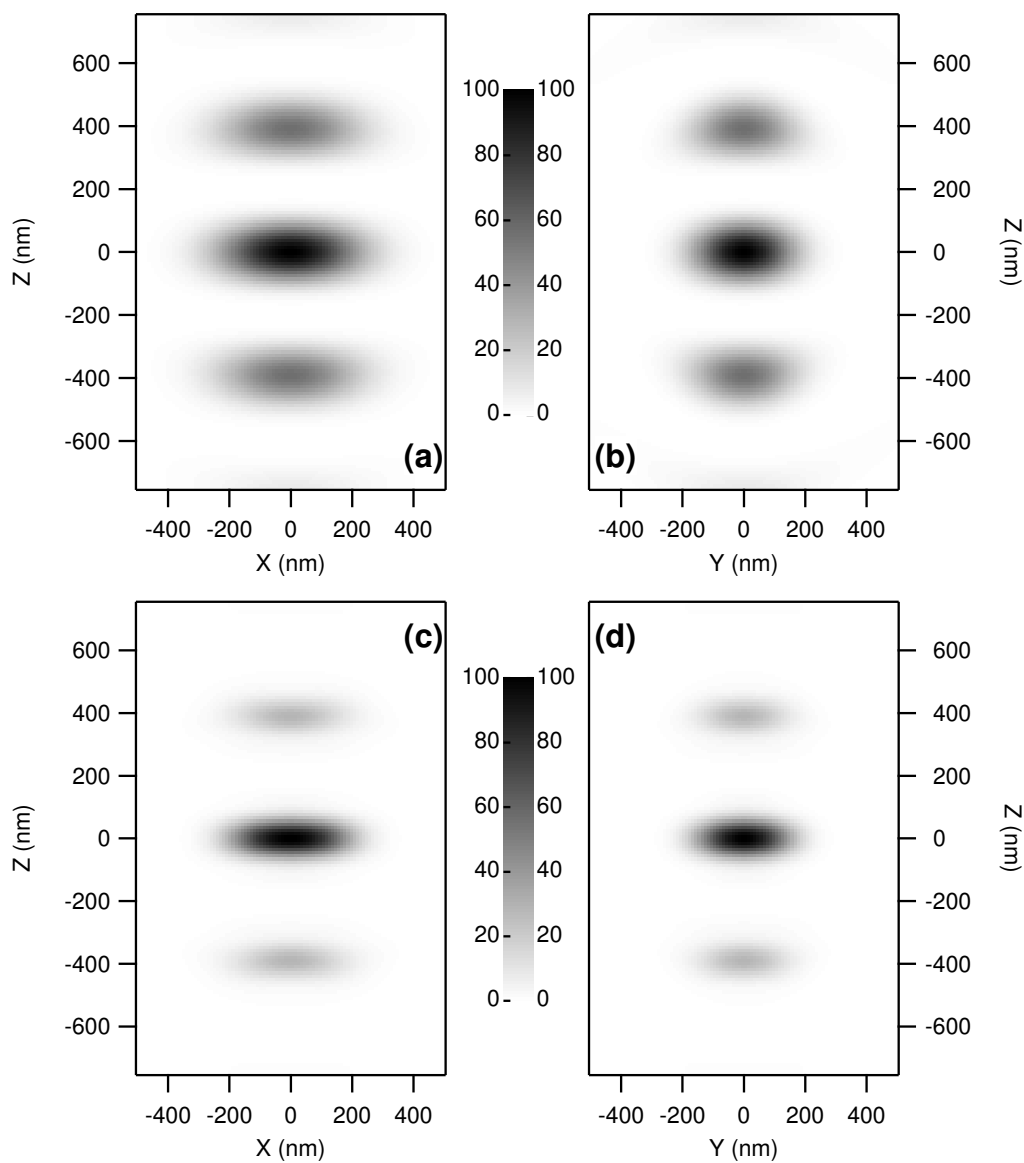


FIG. 5.28 – (a) et (b) représentent respectivement les coupes longitudinales en (XOZ) et en (YOZ), du volume d'excitation à deux photons d'un 4π -microscope. Le Laser ($\lambda = 2 \times 488\text{nm}$) est polarisé rectilignement selon X. (c) et (d) représentent respectivement les coupes longitudinales en (XOZ) et en (YOZ), du volume de détection d'un 4π -microscope de type C fonctionnant avec une excitation à 2 photons. La fluorescence est considérée comme monochromatique ($\lambda=525\text{nm}$). $NA=1.3$, $m=40$ et le trou confocal a un diamètre de 20 microns.

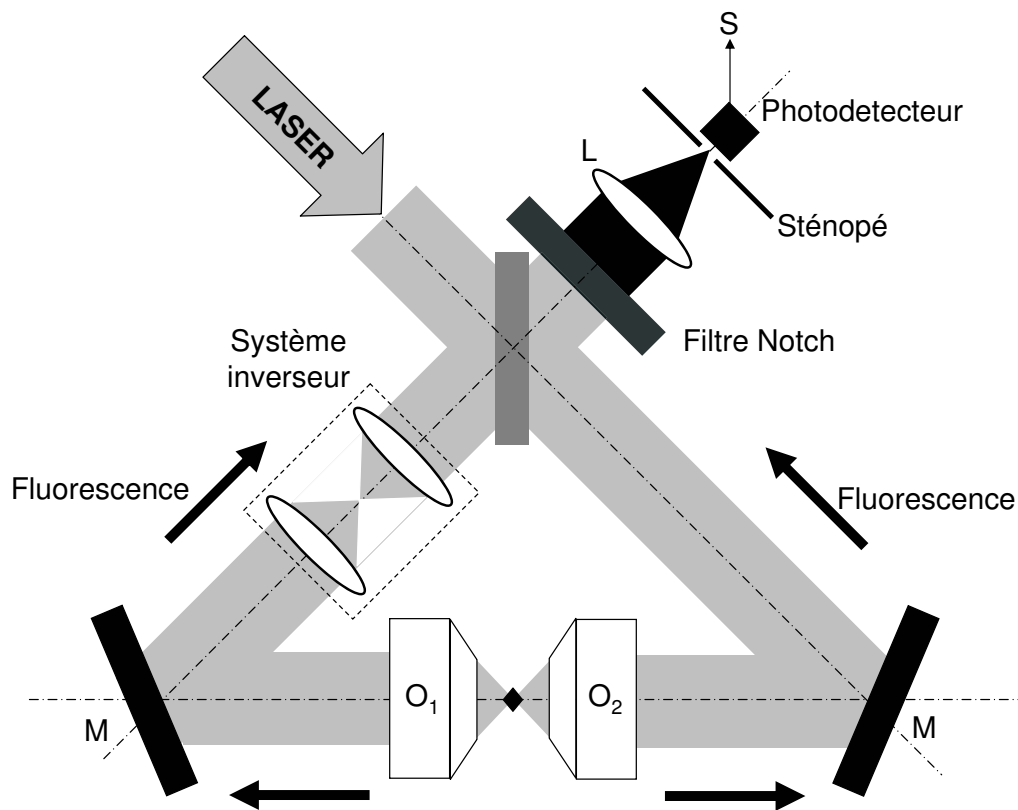


FIG. 5.29 – 4π -microscope de forme classique, modifié pour accroître la résolution latérale.

images en ajoutant un système inverseur sur l'un des bras. Ce système inverseur est en fait un système afocal de grossissement -1 . Dans ce cas, les deux images ne sont plus symétriques par rapport au plan focal de la lentille de tube mais par rapport au foyer. Ce système est équivalent à un microscope à un objectif qui observe deux dipôles cohérents symétriques par rapport au foyer de l'objectif (cf. fig. 5.30).

5.3.2 Calcul de la CEF

Approximation scalaire

Pour comprendre pourquoi la résolution latérale est améliorée, plaçons nous dans les conditions de Fresnel en faisant l'approximation scalaire décrite dans le chapitre 5.1.3.3. Lorsque le fluorophore est dans le plan focal commun

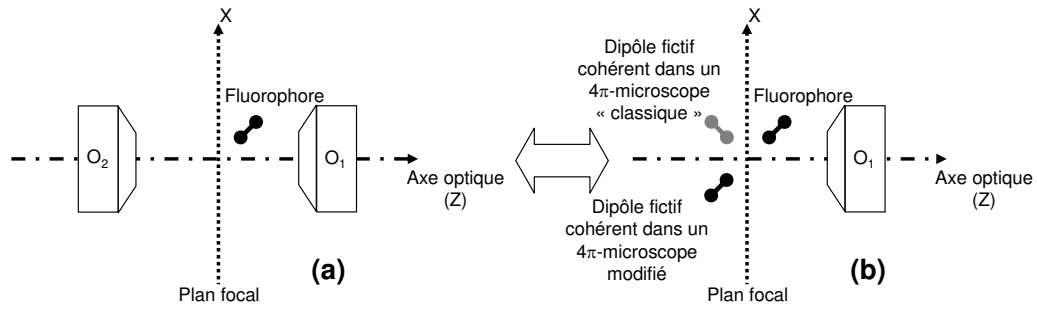


FIG. 5.30 – (a) représente un fluorophore dans le plan d’observation des deux objectifs d’un 4π -microscope. En (b) un objectif sert à observer deux fluorophores cohérents, symétriques par rapport au foyer pour notre 4π -microscope modifié ou symétriques par rapport au plan focal pour un 4π -microscope ”classique”. Les montages (a) et (b) sont équivalents du point de vue de l’émission.

des objectifs, ses deux images sont des fonctions d’Airy centrées sur les images géométriques. L’intensité en un point du plan focal de coordonnées (x,y) est, pour une source située en $(R,0,0)$ par rapport au foyer,

$$Im_R(x,y) = \left[2 \frac{J_1 \left(\frac{k NA \sqrt{(x-mR)^2 + y^2}}{m} \right)}{\frac{k NA \sqrt{(x-mR)^2 + y^2}}{m}} \right]^2 \quad (5.29)$$

pour un 4π -microscope ”classique” et

$$Im_R(x,y) = \left[\frac{J_1 \left(\frac{k NA \sqrt{(x-mR)^2 + y^2}}{m} \right)}{\frac{k NA \sqrt{(x-mR)^2 + y^2}}{m}} + \frac{J_1 \left(\frac{k NA \sqrt{(x+mR)^2 + y^2}}{m} \right)}{\frac{k NA \sqrt{(x+mR)^2 + y^2}}{m}} \right]^2 \quad (5.30)$$

pour un 4π -microscope modifié. L’efficacité de collection, pour la source située en $(R,0,0)$, est :

$$CEF(R) = \iint_S Im_R(x,y) dx dy \quad (5.31)$$

avec S la surface du sténopé. Dans un premier temps, plaçons nous dans le cas où les surfaces du trou et de la photodiode sont infiniment grandes. Lorsque

le luminophore est au foyer ($R=0$), quelque soit le 4π -microscope, les deux fonctions d'Airy sont superposées et l'intensité collectée est donc égale à :

$$CEF(0) = 8\pi \left(\frac{m}{k NA} \right)^2 \int_0^\infty u \left(\frac{J_1(u)}{u} \right)^2 du \quad (5.32)$$

$$= 4 \mathcal{A} \quad (5.33)$$

De même dans un 4π -microscope "classique", lorsque la source reste dans le plan focal des objectifs, les deux fonctions d'Airy sont superposées. L'intensité détectée est donc constante :

$$CEF(R) = 4 \mathcal{A}. \quad (5.34)$$

Par contre dans un 4π -microscope modifié, nous avons vu que les deux images sont symétriques par rapport au foyer. En considérant qu'au delà de la tache centrale, l'intensité dans la fonction d'Airy est nulle, nous pouvons dire qu'à partir d'une certaine position du fluorophore les deux images n'interfèrent plus, de sorte que

$$Im_R(x, y) = \left[\frac{J_1(u^-)}{u^-} \right]^2 + \left[\frac{J_1(u^+)}{u^+} \right]^2 \quad (5.35)$$

avec

$$u^\pm = \frac{k NA \sqrt{(x \pm m R)^2 + y^2}}{m}. \quad (5.36)$$

D'où

$$CEF(R) = 2 \mathcal{A} \quad \text{pour } R > \frac{1.22\lambda}{2NA}. \quad (5.37)$$

Sur la figure 5.31 (a), nous pouvons effectivement constater qu'en l'absence de trou confocal, la CEF d'un microscope classique est constante alors qu'elle décroît rapidement pour se stabiliser à 50% avec des oscillations pseudo-amorties dans le cas d'un 4π -microscope modifié. La figure 5.31 (b) nous montre que même avec un trou qui a un diamètre à la limite de la diffraction²⁷, notre système double la résolution latérale du microscope. Nous avons vu, dans les chapitres précédents, que la largeur transverse du volume d'efficacité de collection "classique" dépendait essentiellement du rapport du diamètre du trou sur le grossissement du microscope (ϕ/m). Dans notre microscope modifié la largeur du "pic central" de la CEF est, en fait, complètement liée à la largeur de la tache d'Airy. La figure 5.32 nous montre l'influence de l'ouverture numérique de l'objectif sur la largeur transverse du volume d'efficacité de collection d'un 4π -microscope modifié. Cette largeur est donc directement proportionnelle à λ/NA .

²⁷Le diamètre du sténopé est égale à celui de la tâche d'Airy. Plus petit, il ferait chuter le rapport signal à bruit.

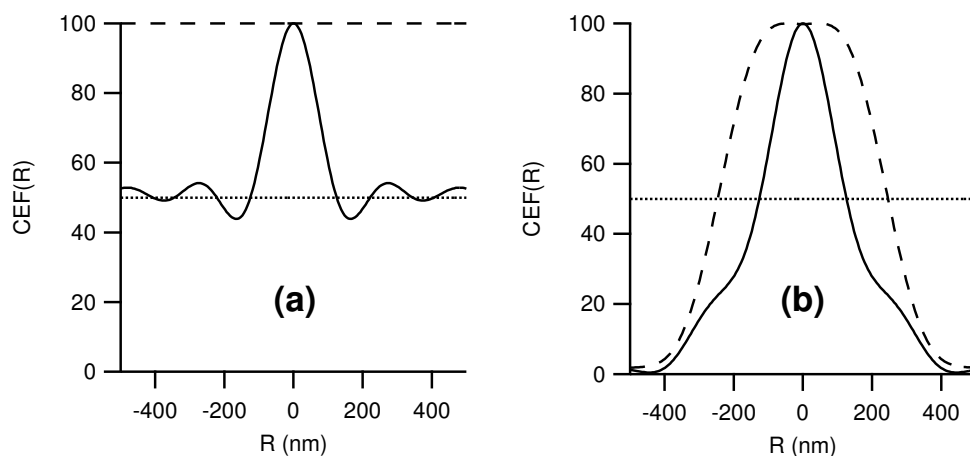


FIG. 5.31 – Coupe dans le plan focal de volumes d'efficacité de collection de 4π -microscopes classiques (courbes en pointillés) et modifiés (courbes continues). Sans trou : (a). Avec un trou de 20 microns adapté à la fonction d'Airy : (b). $NA=1.3$ dans l'huile, $m=40$ et $\lambda=525$ nm.

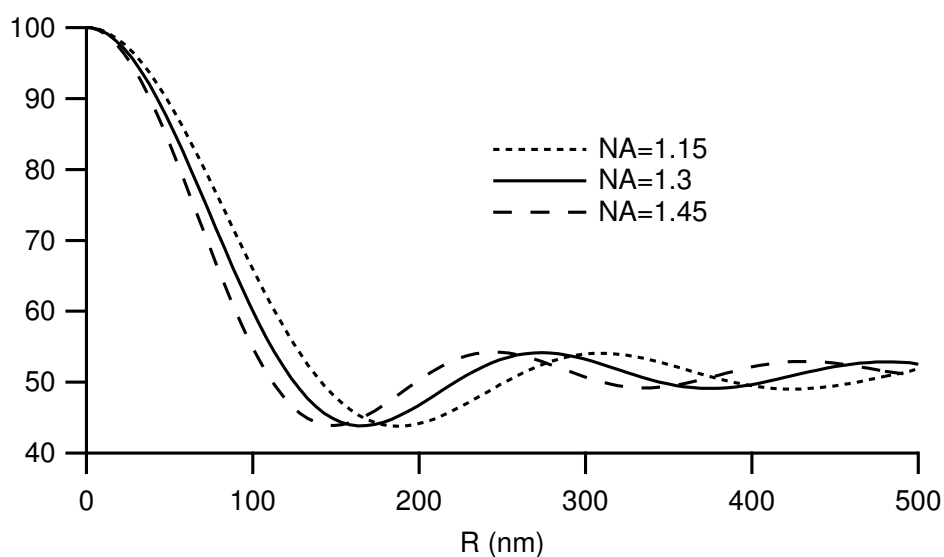


FIG. 5.32 – Influence de l'ouverture numérique de l'objectif sur la largeur transverse du volume d'efficacité de collection d'un 4π -microscope modifié. $\lambda=525$ nm. Le diamètre du trou est très grand par rapport à la tache d'Airy.

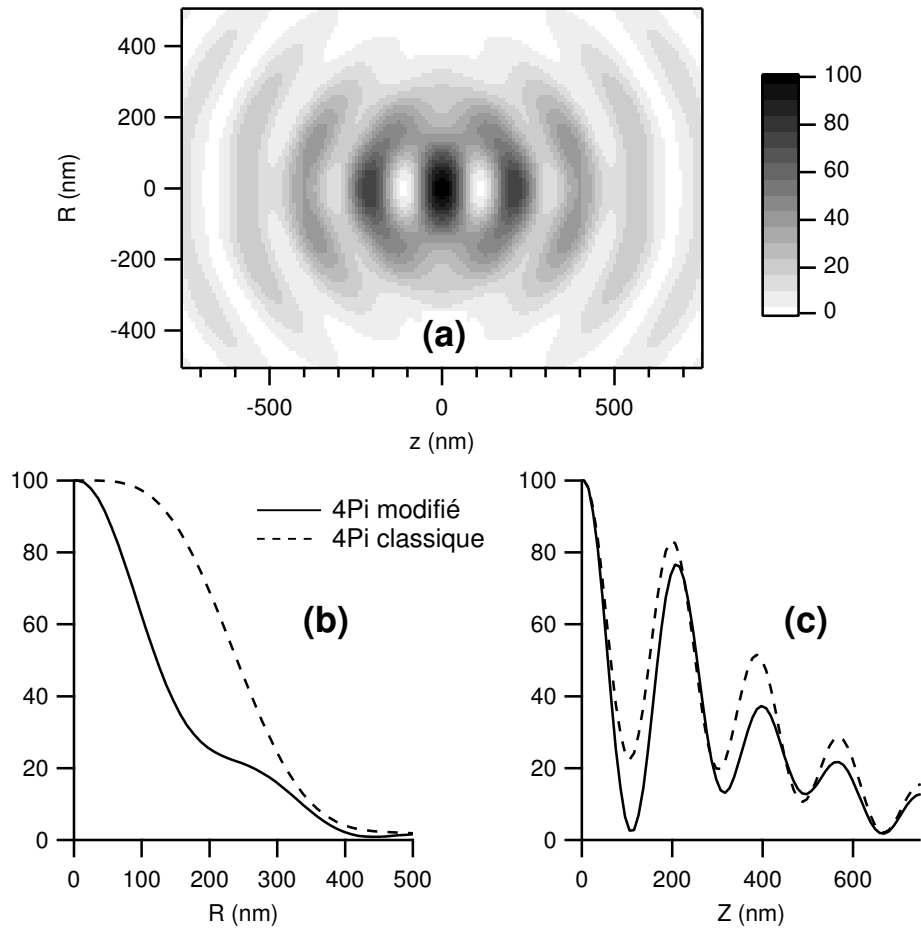


FIG. 5.33 – (a) est une coupe longitudinale du volume d'efficacité de collection d'un 4π -microscope modifié (de type B ou C) de grossissement $\times 40$ avec un objectif d'ouverture numérique $NA=1.3$ dans l'huile, à travers un trou de $20\mu\text{m}$ de diamètre. La fluorescence est considérée comme monochromatique ($\lambda=525\text{nm}$). (b) et (c) comparent la CEF d'un 4π classique à celle d'un 4π modifié respectivement dans le plan transverse et le long de l'axe optique.

Calcul vectoriel en trois dimensions

Pour calculer l'efficacité de collection dans tout l'espace, nous devons utiliser le calcul vectoriel vu au chapitre 4.3.2. Compte tenu des symétries vues précédemment, le champ au niveau du détecteur (au point M) s'écrit comme une somme de deux champs calculés avec la formule (4.33).

$$\vec{E}(\vec{F}_l M, \vec{p}, \vec{pos}) = \vec{E}_1(\vec{F}_l M, \vec{p}, \vec{pos}) + \vec{E}_2(\vec{F}_l M, \vec{p}, -\vec{pos}) \quad (5.38)$$

Dans ce cas, l'intensité détectée par la photodiode à travers le trou confocal de surface S est :

$$I(\vec{p}, \vec{pos}) = \iint_S \left[\vec{E}(\vec{F}_l M, \vec{p}, \vec{pos}) \cdot \vec{E}^*(\vec{F}_l M, \vec{p}, \vec{pos}) \right] dF_l M \quad (5.39)$$

et le volume de collection représenté à la figure 5.33, est décrit par la fonction :

$$CEF(\vec{pos}) = \int_{\lambda} \left\{ \iint I(\vec{p}, \vec{pos}) d\vec{p} \right\} Spectre(\lambda) d\lambda. \quad (5.40)$$

Il est à remarquer que contrairement à la symétrie sur les positions des dipôles, celle sur les orientations a une influence sur la forme longitudinale de la CEF. En plus de réduire le diamètre latéral de la tache centrale, notre méthode améliore donc la CEF le long de l'axe optique comme nous pouvons le constater sur la figure 5.33 (c).

5.3.3 4π -microscope modifié à 1 ou 2 photons

L'efficacité de détection dans notre 4π -microscope modifié de type C est donc le résultat du produit de l'efficacité d'excitation, de la figure 5.19 pour une absorption à 1 photon ou de la figure 5.28 pour une absorption à 2 photons, par l'efficacité de collection de la figure 5.33. Les volumes sont représentés à la figure 5.34. Dans chacun des régimes (1 ou 2 photons) notre système améliore sensiblement la résolution dans toutes les directions. En régime linéaire les dimensions latérales de la tâche sont inférieures à la limite de diffraction et les lobes secondaires sont légèrement atténués [95]. De même, dans le cas d'une excitation à deux photons, nous atteignons des résolutions latérales meilleurs qu'en microscopie confocale à 1 photon tandis que les lobes secondaires sont quasi inexistantes [96]. Nous comparerons ces résultats avec ceux obtenus en 4π -microscopie "classique" dans le chapitre suivant.

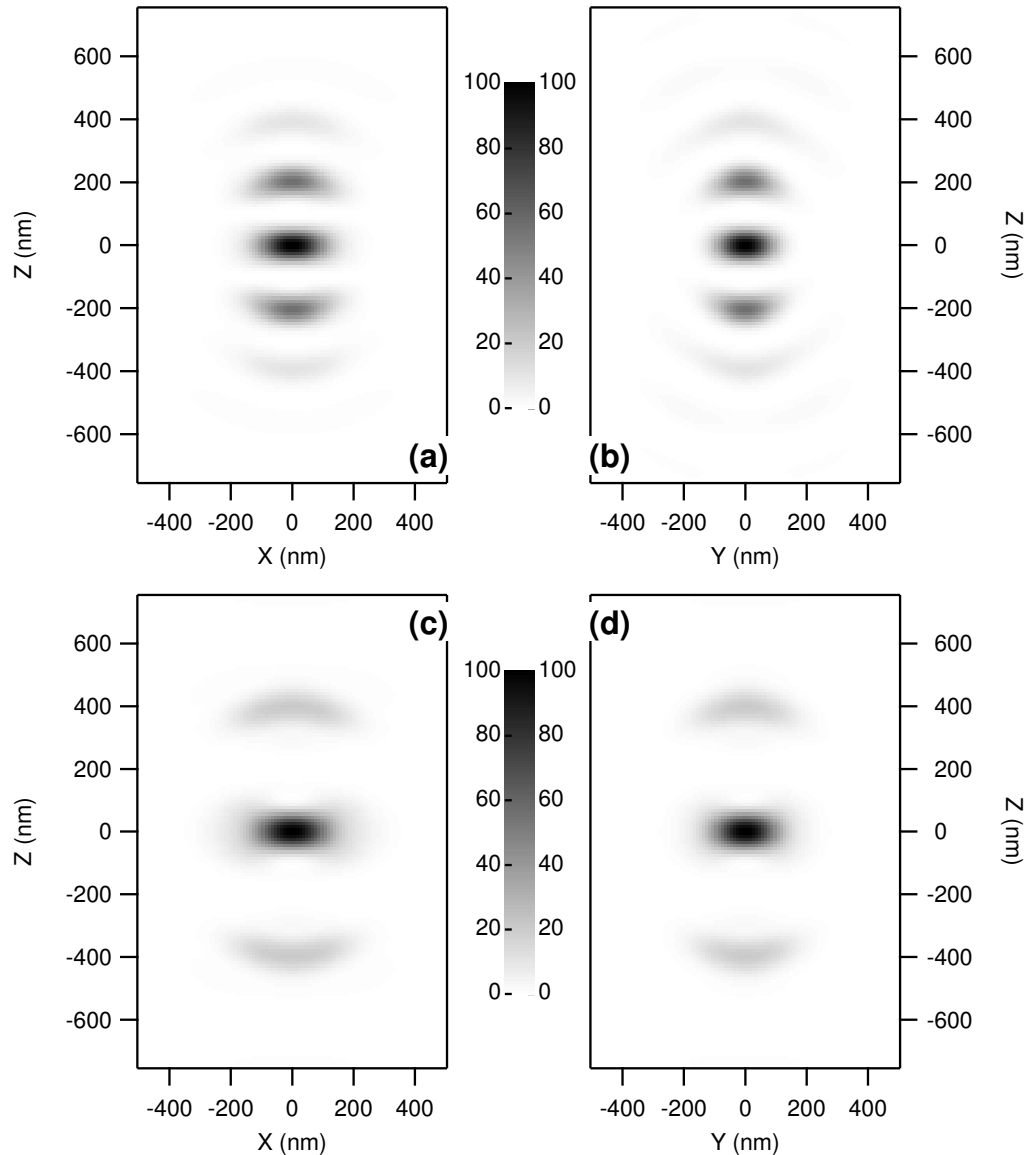


FIG. 5.34 – Cartes d'efficacité de détection dans le plan (XOZ) pour (a) et (c) et dans le plan (YOZ) pour (b) et (d), d'un microscope d'ouverture numérique $NA=1.3$ dans l'huile et de grossissement $m=40$. L'excitation est à 1 photon ($\lambda=488nm$) pour (a) et (b) et à 2 photons ($\lambda = 2 \times 488nm$) pour (c) et (d). Le Laser est gaussien ($\beta=0.1$) polarisé rectilignement selon X . La fluorescence est considérée comme monochromatique ($\lambda=525nm$). Le trou confocal a un diamètre de 20 microns.

5.3.4 Comparaison des volumes de détection

Pour comparer les résolutions atteintes par les différents types de microscopes confocaux à fluorescence, nous avons choisi d'utiliser les caractéristiques de matériels commerciaux qui donnent les meilleurs résultats possibles. Par exemple, l'objectif de Zeiss d'ouverture numérique de 1.3 dans l'huile (et de grossissement $m=40$) est particulièrement bien adapté pour observer des échantillons biologiques en milieu aqueux. Nous avons pris un fluorophore qui a les caractéristiques de "l'Oregon Green" commercialisé par Molecular Probes ($\lambda=525\text{nm}$). Nous avons vu, que dans ce cas, un sténopé de 20 microns de diamètre (commercialisé par exemple par Newport) est particulièrement bien adapté si le grossissement du microscope est $m=40$. Enfin le Laser d'excitation est un Argon ($\lambda=488\text{nm}$) polarisé rectilignement selon X et sa forme est gaussienne ($\beta=0.1$). De même, pour le régime d'excitation à deux photons nous avons utiliser une longueur d'onde ($\lambda = 2 \times 488\text{nm} = 976\text{nm}$) qui nous permet de comparer les résolutions avec celles obtenues en régime d'absorption linéaire à un photon. Nous pouvons par exemple utiliser le Laser picoseconde LDH-P-980 de chez PicoQuant. Remarquons que dans une de nos publications [96], nous avons utilisé un Laser émettant à $\lambda = 880\text{nm}$ pour pouvoir comparer nos résultats numériques à ceux de Gugel et al. [92].

	Confocal	A	C1	C2	Cm1	Cm2
FWHM(x)	124 nm	124 nm	124 nm	162 nm	89 nm	102 nm
FWHM(y)	91 nm	91 nm	91 nm	125 nm	74 nm	90 nm
FWHM(z)	251 nm	50 nm	41 nm	49 nm	40 nm	47 nm
RES(x)	193 nm	193 nm	193 nm	246 nm	153 nm	187 nm
RES(y)	142 nm	142 nm	142 nm	198 nm	122 nm	154 nm
RES(z)	414 nm	76 nm	65 nm	82 nm	63 nm	74 nm
Hlob1	-	66%	63%	-	56%	-
Hlob2	-	18%	16%	29%	11%	21%

TAB. 5.1 – Récapitulatif des valeurs qui décrivent les volumes d'efficacité de détection pour un microscope confocal, un 4π -microscope de type A (A), de type B (B), de type C à 1 et 2 photons (C1 et C2) et pour un 4π -microscope modifié de type C à 1 et 2 photons (Cm1 et Cm2). La largeur de la tache centrale des volumes est donnée par la FWHM à 50% du maximum et par la fonction RES à $1/e^2$. Hlob1 et Hlob2 représentent les hauteurs du premier et du deuxième lobe le long de l'axe Z.

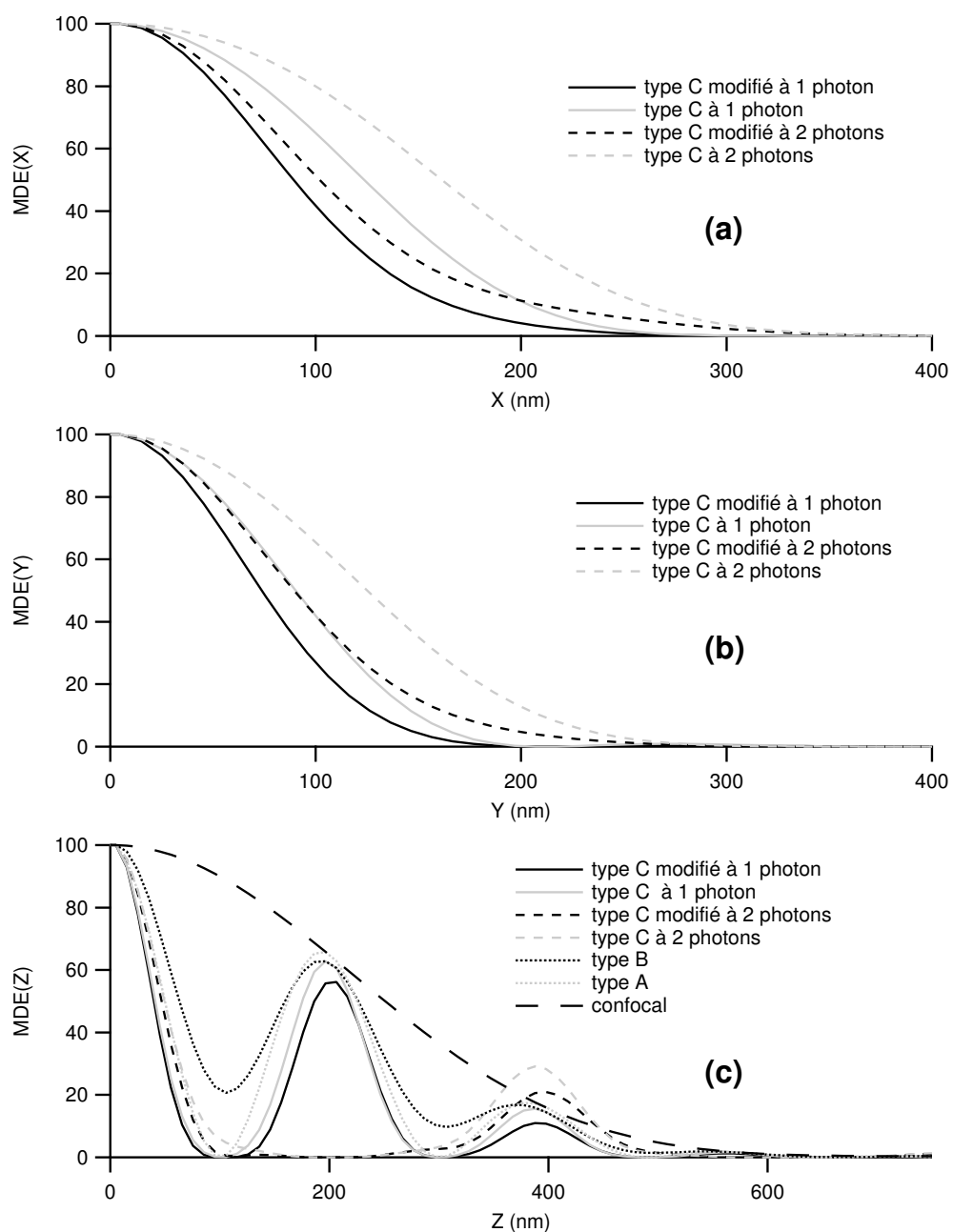


FIG. 5.35 – Coupes des MDE le long des trois directions X , Y et Z . $NA=1.3$ dans l'huile, $m=40$. Le trou a un diamètre de 20 microns. La fluorescence est considérée comme monochromatique ($\lambda = 525\text{nm}$) et le laser est gaussien ($\beta=0.1$) polarisé rectilignement selon X . $\lambda = 488\text{nm}$ dans le cas d'une excitation à 1 photon et $\lambda = 2 \times 488\text{nm}$ dans celui à 2 photons.

5.3.5 Application expérimentale

La réalisation d'un 4π -microscope de type B ou C est très difficile. En effet, pour interférer au niveau de la photodiode, les signaux de fluorescence collectés par chacun des deux objectifs doivent avoir parcouru des chemins optiques strictement de même longueur. Or l'ajout du système inverseur dissymétrise le système, il faut donc aussi modifier l'autre bras du 4π -microscope en tenant compte des effets de dispersion chromatique. Pour ne pas casser la symétrie du montage, l'idée est d'utiliser un système inverseur unidirectionnel sur chaque bras. Sur la figure 5.36, les deux systèmes inverseurs sont formés de deux lentilles cylindriques, de sorte qu'ils ne renversent l'image que dans la direction orthogonale à l'axe des cylindres. Ils sont donc identiques mais orientés à 90 degrés l'un par rapport à l'autre. Sur le détecteur (au point M), le champ provenant d'un fluorophore situé à une position \vec{pos} par rapport au foyer commun des objectifs, est la somme de deux champs qui semblent avoir été émis par deux dipôles situés à des positions \vec{pos}_1 et \vec{pos}_2 du foyer.

$$\vec{E}(\vec{F}_l M, \vec{p}, \vec{pos}) = \vec{E}_1(\vec{F}_l M, \vec{p}, \vec{pos}_1) + \vec{E}_2(\vec{F}_l M, \vec{p}, \vec{pos}_2) \quad (5.41)$$

$$\text{avec} \quad \vec{pos}_1 = \begin{pmatrix} -(\vec{pos} \cdot \vec{e}_x) \\ (\vec{pos} \cdot \vec{e}_y) \\ -(\vec{pos} \cdot \vec{e}_z) \end{pmatrix} \quad \vec{pos}_2 = \begin{pmatrix} (\vec{pos} \cdot \vec{e}_x) \\ -(\vec{pos} \cdot \vec{e}_y) \\ (\vec{pos} \cdot \vec{e}_z) \end{pmatrix} \quad (5.42)$$

Ce double système inverseur, nous permet d'obtenir les mêmes volumes d'efficacité d'émission, de collection et de détection que ceux du 4π -microscope modifié des chapitres précédents, tout en conservant la symétrie du montage.

5.3.6 Microscopie à bioluminescence

Certains luminophores, comme par exemple les molécules chimico- ou bioluminescentes, ne sont pas excités optiquement mais chimiquement. Dans ce cas, les observer avec une bonne résolution est difficile puisque sans faisceau excitateur, l'efficacité de détection du microscope est égale à son efficacité de collection. Pourtant la microscopie chimico- ou bioluminescente a de nombreuses applications; pour faire des analyses biochimiques et détecter la présence de bactéries [78, 97, 98] mais aussi pour comprendre certains phénomènes de biologie cellulaire [99]. La figure 5.37 (a) montre que ni les microscopes confocaux ni même les 4π -microscopes classiques de type B

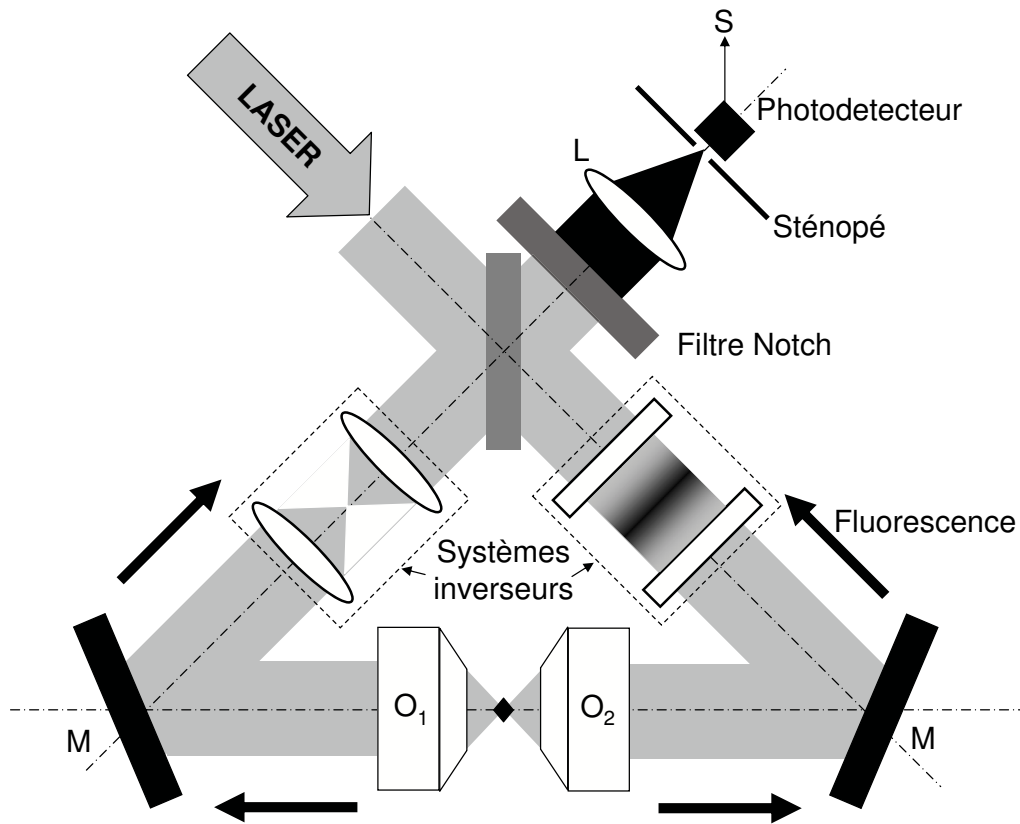


FIG. 5.36 – 4π -microscope à deux systèmes inverseurs formés de lentilles cylindriques. Les axes des cylindres sont dans le plan de la feuille pour le système de droite et orthogonaux à la feuille pour celui de gauche.

n'ont la capacité de résoudre des objets distants de moins de 300 nanomètres dans le plan focal alors que notre système permet d'atteindre une résolution latérale de 175 nanomètres. Bien que notre méthode permette de réduire les dimensions du volume de détection le long de l'axe optique, les lobes secondaires restent très gênants. Il faudra donc travailler sur les algorithmes de déconvolution pour avoir des images bien résolues.

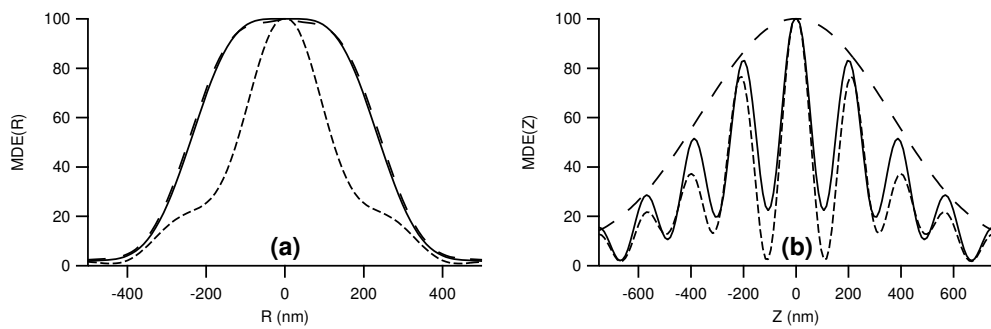


FIG. 5.37 – Coupes latérales **(a)** et longitudinales **(b)** des MDE en microscopie bioluminescente. $NA=1.3$ dans l'huile, $m=40$. Le trou a un diamètre de 20 microns. La fluorescence est considérée comme monochromatique ($\lambda = 525nm$). Courbes en pointillés longs : microscope confocal, continues : 4π -microscope de type B et en pointillés courts : 4π -microscope modifié de type B.

Conclusion

Pour améliorer la compréhension des processus de signalisation cellulaires, les biologistes ont besoin d'outils leur permettant entre autres de suivre et de localiser certaines molécules d'intérêt. Les progrès récents dans le domaine des caméras ultrasensibles et l'apparition de nouvelles sources très lumineuses et stables permettent de suivre des molécules individuelles avec une précision nanométrique dans le plan focal de l'objectif du microscope. De plus, la commercialisation par Leica d'un 4π -microscope fonctionnant en régime d'absorption à deux photons semble indiquer que les expérimentateurs des laboratoires de biologie considèrent que les inconvénients d'un tel microscope (Stabilité et difficultés de réglage) sont négligeables comparés à ses avantages (Collection de la fluorescence dans tout l'espace et une résolution le long de l'axe optique inférieure à 100 nanomètres). Néanmoins, ces techniques présentent encore des limitations non-négligeables. Nous n'en citerons que deux : la précision sur la localisation axiale des luminophores, des techniques de suivi de molécules individuelles et la résolution latérale des microscopes confocaux (y compris des 4π -microscopes). Ce travail de thèse avait donc pour objectif de réaliser un système basé sur un 4π -microscope qui permettrait de localiser avec une grande précision les luminophores le long de l'axe optique.

Après une rapide modélisation du problème qui nous a permis d'étudier les nombreux avantages de la méthode, nous avons construit un 4π -microscope couplé à un interféromètre de Michelson. Ce système utilise les caractéristiques de la source (notamment son spectre) pour la localiser avec une précision qui ne dépend que du rapport signal à bruit. Cependant remarquons que la réalisation expérimentale a souligné la sensibilité de la technique aux aberrations (en particulier chromatiques).

Parallèlement à ce travail, nous avons entrepris de développer une méthode de calcul de la diffraction dans un microscope, notamment pour pouvoir calculer la résolution dans toutes les directions de l'espace, de tous les types de microscopes confocaux à fluorescence. A partir de ces travaux, nous avons proposé un système simple à inclure dans les 4π -microscopes (de type C)

pour augmenter de 30% leur résolution latérale. Le 4π -microscope commercialisé par Leica pourrait ainsi devenir très efficace (du point de vue de la résolution) dans toutes les directions.

Ces résultats (expérimentaux et numériques) tendent à montrer que le 4π -microscope peut être un outil puissant encore perfectible qui, par sa conception, reste difficile à utiliser.

Les perspectives de ces travaux sont multiples. Tout d'abord, il est possible de modifier notre montage expérimental pour qu'il y ait moins d'aberrations chromatiques, par exemple, en remplaçant les objectifs par des objectifs de meilleure qualité. Il est aussi envisageable de suivre les molécules sur de plus grandes distances en utilisant un interféromètre de Linnik à la place de l'interféromètre de Michelson. Et enfin, il serait intéressant d'utiliser ce montage sur des échantillons bioluminescents.

Pour ce qui concerne les calculs de diffraction dans les microscopes, de nombreuses autres applications sont envisageables (certains sont en cours de développement). Par exemple, ces calculs servent actuellement à modéliser l'imagerie de billes de polystyrène en microscopie CARS. D'autre part, nous pourrions imaginer appliquer la méthode utilisée pour augmenter la résolution latérale des 4π -microscopes, à d'autres systèmes comme le microscope à quatre objectifs du groupe de E. H. K. Stelzer. Enfin il serait, sans doute, très utile d'étudier le problème de la déconvolution des images en fonction de la forme du volume d'efficacité de détection.

Bibliographie

- [1] D. B. Murphy, *Fundamentals of light microscopy and electronic imaging*. Wiley-Liss, 2001.
- [2] K. Brejc, T. K. Sixma, P. A. Kitts, S. R. Kain, R. Y. Tsien, M. Ormö, and S. J. Remington, “Structural basis for dual excitation and photoisomerization of the aequorea victoria green fluorescent protein,” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 94, pp. 2306–2311, 1997.
- [3] J. Mertz and L. Moreaux, “Second harmonic generation by focused excitation of inhomogeneously distributed scatterers,” *Optics Communications*, vol. 196, no. 16, pp. 325–330, 2001.
- [4] D. Débarre, W. Supatto, E. Farge, B. Moulia, M.-C. Schanne-Klein, and E. Beaurepaire, “Velocimetric third-harmonic generation microscopy : micrometer-scale quantification of morphogenetic movements in unstained embryos,” *Optics Letters*, vol. 29, no. 24, pp. 2881–2883, 2004.
- [5] A. Zumbusch, G. R. Holtom, and X. S. Xie, “Three-dimensional vibrational microscopy using coherent anti-stokes raman scattering,” *Physical Review Letters*, vol. 82, no. 20, p. 4142, 1999.
- [6] W. Denk, J. H. Strickler, and W. W. Webb, “Two-photon laser scanning fluorescence microscopy,” *Science*, vol. 248, pp. 73–76, 1990.
- [7] C. J. R. Sheppard and M. Gu, “Image formation in two-photon fluorescence microscopy,” *Optik*, vol. 86, pp. 104–106, 1990.
- [8] S. W. Hell, K. Bahlmann, M. Schrader, A. Soini, H. Malak, I. Gryczynski, and J. R. Lakowicz, “Three-photon excitation in fluorescence microscopy,” *Journal of Biomedical Optics*, vol. 1, pp. 71–74, 01 1996.
- [9] E. Abbe, “Beitrage zur theorie des mikroskops und der mikroskopischen wahrnehmung,” *Archiv fur mikroskopische Anatomie*, vol. 9, pp. 413–468, 1873.
- [10] L. Rayleigh, “On the theory of optical images with special reference to the microscope,” *Philos. Mag.*, vol. 42, no. 5, pp. 167–195, 1896.

- [11] D. Axelrod, "Total internal reflection fluorescence at biological surfaces," in *Noninvasive Techniques in Cell Biology* (J. K. Foskett and S. Grinstein, eds.), pp. 93–127, Wiley-Liss, 1990.
- [12] V. Westphal and S. W. Hell, "Nanoscale resolution in the focal plane of an optical microscope," *Physical Review Letters*, vol. 94, p. 143903, 2005.
- [13] S. W. Hell and J. Wichmann, "Breaking the diffraction resolution limit by stimulated emission : stimulated-emission-depletion fluorescence microscopy," *Optics Letters*, vol. 19, no. 11, pp. 780–782, 1994.
- [14] V. Westphal, J. Seeger, T. Salditt, and S. W. Hell, "Stimulated emission depletion microscopy on lithographic nanostructures," *Journal of Physics B*, vol. 38, pp. S695–S705, 2005.
- [15] H. Rigneault, J.-M. Lourtioz, C. Delalande, and A. Levenson, *La nanophotonique*, ch. 10-Nanobiophotonique, pp. 311–336. Hermès, 2005.
- [16] S. Hell and E. H. K. Stelzer, "Properties of a 4pi confocal fluorescence microscope," *Journal of the Optical Society of America A*, vol. 9, no. 12, pp. 2159–2166, 1992.
- [17] C. J. R. Sheppard and Y. R. Gong, "Improvement in axial resolution by interference confocal microscopy," *Optik*, vol. 87, no. 3, pp. 129–132, 1991.
- [18] E. H. K. Stelzer and S. Lindek, "Fundamental reduction of the observation volume in far-field light-microscopy by detection orthogonal to the illumination axis - confocal theta microscopy," *Optics Communications*, vol. 111, no. 5-6, pp. 536–547, 1994.
- [19] E. H. K. Stelzer, C. Cremer, and S. Lindek, "Theory and applications of confocal theta-microscopy," *Zoological Studies*, vol. 34, pp. 67–69, 1995.
- [20] S. Lindek and E. H. K. Stelzer, "Optical transfer functions for confocal theta fluorescence microscopy," *Journal of the Optical Society of America A*, vol. 13, no. 3, pp. 479–482, 1996.
- [21] S. Lindek and E. H. K. Stelzer, "Resolution improvement by nonconfocal theta microscopy," *Optics Letters*, vol. 24, no. 21, pp. 1505–1507, 1999.
- [22] S. Lindek, R. Pick, and E. H. K. Stelzer, "Confocal theta microscope with 3 objective lenses," *Review of scientific instruments*, vol. 65, no. 11, pp. 3367–3372, 1994.
- [23] J. Swoger, J. Huisken, and E. H. K. Stelzer, "Multiple imaging axis microscopy improves resolution for thick-sample applications," *Optics Letters*, vol. 28, no. 18, pp. 1654–1656, 2003.

- [24] O. Haeberlé, C. Xu, A. Dieterlen, and S. Jacquy, "Multiple-objective microscopy with three-dimensional resolution near 100 nm and a long working distance," *Optics Letters*, vol. 26, no. 21, pp. 1684–1686, 2001.
- [25] H. Rigneault and P.-F. Lenne, "Fluorescence correlation spectroscopy on a mirror," *Journal of the Optical Society of America A*, vol. 20, no. 10, pp. 2203–2214, 2003.
- [26] S. Lindek, J. Swoger, and E. H. K. Stelzer, "Single-lens theta microscopy : resolution, efficiency and working distance," *Journal of modern optics*, vol. 46, no. 5, pp. 843–858, 1999.
- [27] N. Sandeau, H. Rigneault, P.-F. Lenne, and H. Giovannini, "Axial localization of luminophores by partial coherence interferometry," in *Biophotonics Micro- and Nano-Imaging* (D. Anselmetti, ed.), vol. 5462, pp. 51–56, SPIE, 2004.
- [28] E. Etienne, *Spectroscopie de Correlation de Fluorescence sur miroir : Détection et exaltation de la luminescence de molécules biologiques individuelles diffusant en solution ou en milieu cellulaire*. Thèse. Université Paul Cézanne Aix-Marseille III, 2003.
- [29] P. F. Lenne, E. Etienne, and H. Rigneault, "Subwavelength patterns and high detection efficiency in fluorescence correlation spectroscopy using photonic structures," *Applied Physics Letters*, vol. 80, no. 22, pp. 4106–4108, 2002.
- [30] A. Dubois, L. Vabre, A. C. Boccara, and E. Beaurepaire, "High-resolution full-field optical coherence tomography with a linnik microscope," *Applied optics*, vol. 41, no. 4, pp. 805–812, 2002.
- [31] M. Davidson, K. Kaufman, I. Mazor, and F. Cohen, "An application of interference microscopy to integrated circuit inspection and metrology," in *Integrated circuit metrology, inspection and process control*, vol. 775, pp. 233–247, SPIE, 1987.
- [32] G. S. Kino and S. S. C. Chim, "Mirau correlation microscope," *Applied Optics*, vol. 29, no. 26, pp. 3775–3783, 1990.
- [33] F. C. Chang and G. S. Kino, "325-nm interference microscope," *Applied Optics*, vol. 37, no. 16, pp. 3471–3479, 1998.
- [34] T. Okamoto, S. Kawata, and S. Minami, "Fourier transform spectrometer with a self-scanned diode array," *Applied Optics*, vol. 23, no. 2, pp. 269–273, 1984.
- [35] T. H. Barnes, "Photodiode array fourier transform specrometer with improved dynamic range," *Applied Optics*, vol. 24, no. 22, pp. 3702–3706, 1985.

- [36] L. Mandel, "Interferences and the alford-gold effect," *Journal of the Optical Society of America*, vol. 52, pp. 1335–+, 1962.
- [37] H. Giovannini, *Étude et mise en oeuvre des méthodes de démodulation pour les capteurs à fibres optiques utilisant le codage de modulation spectrale*. Thèse. Université Paul Cézanne Aix-Marseille III, 1991.
- [38] T. Bosselmann and R. Ulrich, "High-accuracy position-sensing with fiber-coupled white-light interferometers," *Proceedings of the society of photo-optical instrumentation engineers*, vol. 514, pp. 361–364, 1984.
- [39] K. Takada, S. Tsurumi, S. Nakajima, and J. Noda, "Method for measuring the trench depth of a very-large-scale-integration dynamic random-access memory capacitor based on a michelson interferometer," *Optics Letters*, vol. 11, no. 12, pp. 767–769, 1986.
- [40] P. Cielo and C. Delisle, "Multiplexage en communication optique par interférométrie à grande différence de marche en lumière blanche," *Canadian Journal of Physics*, vol. 54, pp. 2322–2331, 1976.
- [41] K. Tanaka and Y. Ohtsuka, "Laser heterodyne detection of slowly varying displacements," *Journal of Optics*, vol. 8, pp. 37–40, 1977.
- [42] D. K. Hamilton and C. J. R. Sheppard, "Interferometric measurements of the defocus signal $v(z)$ in the confocal scanning optical microscope," *Journal of Applied Physics*, vol. 60, no. 8, pp. 2708–2712, 1986.
- [43] A. Dubois, J. Selb, L. Vabre, and A. C. Boccara, "Phase measurements with wide-aperture interferometers," *Applied Optics*, vol. 39, no. 14, pp. 2326–2331, 2000.
- [44] J. Liu and R. M. A. Azzam, "Polarization properties of corner-cube retroreflectors : Theory and experiment," *Applied Optics*, vol. 36, no. 7, pp. 1553–1559, 1997.
- [45] N. Sandeau, H. Giovannini, P.-F. Lenne, and H. Rigneault, "Observation of the interferences between the emitted beams in a 4pi microscope by partial coherence interferometry," *Applied Physics Letters*, vol. 87, no. 18, p. 181103, 2005.
- [46] M. Schrader, U. G. Hofmann, and S. W. Hell, "Ultrathin fluorescent layers for monitoring the axial resolution in confocal and two-photon fluorescence microscopy," *Journal of Microscopy-Oxford*, vol. 191, pp. 135–140, 1998.
- [47] C. Mariller and M. Lequime, "Fiber-optic "white-light" birefringent temperature sensor.," in *Conference on Fiber Optic Sensors*, pp. 121–130, SPIE, 1987.

- [48] H. R. Giovannini, S. J. Huard, and M. R. Lequime, "Influence of chromatic dispersion on a dual-wavelength passive-homodyne detection method for fiber-coupled interferometers," *Applied Optics*, vol. 33, no. 13, pp. 2721–2733, 1994.
- [49] I. H. Malitson, "Interspecimen comparison of the refractive index of fused silica," *Journal of the Optical Society of America*, vol. 55, no. 10, pp. 1205–1209, 1965.
- [50] P. Debye, "Das verhalten von lichtwellen in der nahe eines brennpunktes oder einer brennlinie," *Ann. Phys.*, vol. 30, p. 755, 1909.
- [51] J. Picht, "Über den schwingungsvorvang, der einem bliebigen (astigmatischen) strahlenbündel entspricht," *Ann. Phys.*, vol. 77, p. 685, 1925.
- [52] J. B. Keller, "The geometric optics theory of diffraction," in *The McGill Symposium on Microwave Optics*, vol. 2, pp. 207–210, 1959.
- [53] J. B. Keller, "Geometrical theory of diffraction," *Journal of the Optical Society of America*, vol. 52, pp. 116–130, 1962.
- [54] E. Wolf, "Electromagnetic diffraction in optical systems. i. an integral representation of the image field," *Proceedings of the Royal Society of London A*, vol. 253, pp. 349–357, 1959.
- [55] B. Richards and E. Wolf, "Electromagnetic diffraction in optical systems. ii. structure of the image field in an aplanatic system," *Proceedings of the Royal Society of London A*, vol. 253, pp. 358–379, 1959.
- [56] R. K. Luneberg, *Mathematical Theory of Optics*. University of California Press, 1944.
- [57] J. Gasper, G. C. Sherman, and J. J. Stamnes, "Reflection and refraction of an arbitrary electromagnetic wave at a plane interface," *Journal of the Optical Society of America*, vol. 66, pp. 955–961, 1976.
- [58] H. Ling and S.-W. Lee, "Focusing of electromagnetic waves through a dielectric interface," *Journal of the Optical Society of America A*, vol. 1, pp. 965–973, 1984.
- [59] J. J. Stamnes, *Waves in focal Regions*. Adam Hilger, 1986.
- [60] S. Chang, J. H. Jo, and S. S. Lee, "Theoretical calculations of optical force exerted on dielectric sphere in the evanescent field generated with a totally-reflected focused gaussian beam," *Optics Communications*, vol. 108, pp. 133–143, 1994.
- [61] A. Egner, M. Schrader, and S. W. Hell, "Refractive index mismatch induced intensity and phase variations in fluorescence confocal, multiphoton and 4pi-microscopy," *Optics Communications*, vol. 153, pp. 211–217, 08 1998.

- [62] O. Haeberlé, “Focusing of light through a stratified medium : a practical approach for computing microscope point spread functions. part i : Conventional microscopy,” *Optics Communications*, vol. 216, no. 1-3, pp. 55–63, 2003.
- [63] S. H. Wiersma, P. Török, T. D. Visser, and P. Varga, “Comparison of different theories for focusing through a plane interface,” *Journal of the Optical Society of America A*, vol. 14, no. 7, pp. 1482–1490, 1997.
- [64] P. Török, Z. Varga, P. and Laczik, and G. R. Booker, “Electromagnetic diffraction of light focused through a planar interface between materials of mismatched refractive indices : an integral representation,” *Journal of the Optical Society of America A*, vol. 12, pp. 325–332, 1995.
- [65] S. H. Wiersma and T. D. Visser, “Defocusing of a converging electromagnetic wave by a plane dielectric interface,” *Journal of the Optical Society of America A*, vol. 13, pp. 320–325, 1996.
- [66] M. Gu and C. J. R. Sheppard, “3-dimensional transfer-functions in 4pi confocal microscopes,” *Journal of the Optical Society of America A*, vol. 11, no. 5, pp. 1619–1627, 1994.
- [67] J. Enderlein, “Theoretical study of detection of a dipole emitter through an objective with high numerical aperture,” *Optics Letters*, vol. 25, no. 9, pp. 634–636, 2000.
- [68] M. Bohmer and J. Enderlein, “Orientation imaging of single molecules by wide-field epifluorescence microscopy,” *Journal of the Optical Society of America B*, vol. 20, no. 3, pp. 554–559, 2003.
- [69] D. Patra, I. Gregor, and J. Enderlein, “Image analysis of defocused single-molecule images for three-dimensional molecule orientation studies,” *Journal of Physical Chemistry A*, vol. 108, no. 33, pp. 6836–6841, 2004.
- [70] P. Török, “Propagation of electromagnetic dipole waves through dielectric interfaces,” *Optics Letters*, vol. 25, no. 19, pp. 1463–1465, 2000.
- [71] J. Enderlein and M. Bohmer, “Influence of interface-dipole interactions on the efficiency of fluorescence light collection near surfaces,” *Optics letters*, vol. 28, no. 11, pp. 941–943, 2003.
- [72] O. Haeberlé, M. Ammar, H. Furukawa, K. Tenjimbayashi, and P. Török, “Point spread function of optical microscopes imaging through stratified media,” *Optics Express*, vol. 11, no. 22, pp. 2964–2969, 2003.
- [73] N. Martini, J. Bewersdorf, and S. W. Hell, “A new high-aperture glycerol immersion objective lens and its application to 3d-fluorescence microscopy,” *Journal of Microscopy*, vol. 206, no. 2, pp. 146–151, 2002.

- [74] S. T. Hess and W. W. Webb, "Focal volume optics and experimental artifacts in confocal fluorescence correlation spectroscopy," *Biophysical Journal*, vol. 83, no. 4, pp. 2300–2317, 2002.
- [75] L. Wawrezinieck, P.-F. Lenne, D. Marguet, and H. Rigneault, "Fluorescence correlation spectroscopy to determine diffusion laws : application to live cell membranes," in *Biophotonics Micro- and Nano-Imaging* (D. Anselmetti, ed.), vol. 5462, pp. 92–102, SPIE, 2004.
- [76] A. Masuda, K. Ushida, and T. Okamoto, "New fluorescence correlation spectroscopy enabling direct observation of spatiotemporal dependence of diffusion constants as an evidence of nomalous transport in extracellular matrices," *Biophysical Journal*, vol. 88, pp. 3584–3591, 2005.
- [77] F. H. Johnson, H. Eyring, R. Steblay, H. Chaplin, C. Huber, and G. Gherardi, "The nature and control of reactions in bioluminescence," *The Journal of General Physiology*, vol. 28, pp. 463–537, 1945.
- [78] T. Takahashi, Y. Nakakita, J. Watari, and K. Shinotsuka, "A new rapid technique for detection of microorganisms using bioluminescence and fluorescence microscope method," *Journal of Bioscience and Bioengineering*, vol. 89, no. 5, pp. 509–513, 2000.
- [79] C. M. Blanca and S. W. Hell, "Axial superresolution with ultrahigh aperture lenses," *Optics Express*, vol. 10, no. 17, pp. 893–898, 2002.
- [80] L. Wawrezinieck, *Mesures de lois de diffusion par spectroscopie de corrélation de fluorescence pour sonder l'organisation submicronique des membranes biologiques*. Thèse. Université de la Méditerranée Aix-Marseille II, 2006 (prévision).
- [81] G. Toraldo di Francia, "Super-gain antennas and optical resolving power," *Nuovo Cimento Supplement*, vol. 9, pp. 426–435, 1952.
- [82] G. Toraldo di Francia, "Nuevo pupille superresolventi," *Atti Fond. Giorgio Ronchi*, vol. 7, pp. 366–372, 1952.
- [83] M. G. L. Gustafsson, "Surpassing the lateral resolution limit by a factor of two using structured illumination microscopy," *Journal of Microscopy*, vol. 198, pp. 82–87, 2000.
- [84] I. Leiserson, S. G. Lipson, and V. Safaris, "Superresolution in far-field imaging," *Optics Letters*, vol. 25, no. 4, pp. 209–211, 2000.
- [85] S. W. Hell, S. Lindek, C. Cremer, and E. H. K. Stelzer, "Measurement of the 4pi-confocal point-spread function proves 75 nm axial resolution," *Applied Physics Letters*, vol. 64, no. 11, pp. 1335–1337, 1994.
- [86] S. W. Hell, E. H. K. Stelzer, S. Lindek, and C. Cremer, "Confocal microscopy with an increased detection aperture : type-b 4pi confocal microscopy," *Optics Letters*, vol. 19, no. 3, pp. 222–224, 1994.

- [87] M. Nagorni and S. W. Hell, “Coherent use of opposing lenses for axial resolution increase. ii. power and limitation of nonlinear image restoration,” *Journal of the Optical Society of America A*, vol. 18, no. 1, pp. 49–54, 2001.
- [88] M. Schrader, S. W. Hell, and H. T. M. van der Voort, “Three-dimensional super-resolution with a 4pi-confocal microscope using image restoration,” *Journal of Applied Physics*, vol. 84, no. 8, pp. 4033–4042, 1998.
- [89] A. Chomik, A. Dieterlen, C. Xu, O. Haeberlé, J. J. Meyer, and S. Jacquy, “Quantification in optical sectioning microscopy : a comparison of some deconvolution algorithms in view of 3d image segmentation,” *Journal of Optics*, vol. 28, pp. 225–233, 1997.
- [90] C. M. Blanca, J. Bewersdorf, and S. W. Hell, “Single sharp spot in fluorescence microscopy of two opposing lenses,” *Applied Physics Letters*, vol. 79, no. 15, pp. 2321–2323, 2001.
- [91] M. Martinez-Corral, A. Pons, and M. T. Caballero, “Axial apodization in 4pi-confocal microscopy by annular binary filters,” *Journal of the Optical Society of America A*, vol. 19, no. 8, pp. 1532–1536, 2002.
- [92] H. Gugel, J. Bewersdorf, S. Jakobs, J. Engelhardt, R. Storz, and S. W. Hell, “Cooperative 4pi excitation and detection yields sevenfold sharper optical sections in live-cell microscopy,” *Biophysical Journal*, vol. 87, no. 6, pp. 4146–4152, 2004.
- [93] S. Hell and E. H. K. Stelzer, “Fundamental improvement of resolution with a 4pi-confocal fluorescence microscope using two-photon excitation,” *Optics Communications*, vol. 93, pp. 277–282, 1992.
- [94] M. Nagorni and S. W. Hell, “Coherent use of opposing lenses for axial resolution increase in fluorescence microscopy. i. comparative study of concepts,” *Journal of the Optical Society of America A*, vol. 18, no. 1, pp. 36–48, 2001.
- [95] N. Sandeau and H. Giovannini, “Increasing the lateral resolution of 4pi fluorescence microscopes,” *Journal of the Optical Society of America A*, vol. 23, no. 5, 2006.
- [96] N. Sandeau and H. Giovannini, “Arrangement of a 4pi microscope for reducing the confocal detection volume with two-photon excitation,” *Optics Communications*, Accepted Feb. 2006.
- [97] A. Roda, M. Guardigli, P. Pasini, M. Mirasoli, E. Michelini, and M. Musiani, “Bio- and chemiluminescence imaging in analytical chemistry,” *Analytica Chimica Acta*, vol. 541, no. 1-2, pp. 25–36, 2005.

- [98] P. Pasini, M. Musiani, C. Russo, P. Valenti, G. Aicardi, J. E. Crabtree, M. Baraldini, and A. Roda, "Chemiluminescence imaging in bioanalysis," *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, vol. 18, no. 4-5, pp. 555–564, 1998.
- [99] R. Creton and L. F. Jaffe, "Chemiluminescence microscopy as a tool in biomedical research," *Biotechniques*, vol. 31, no. 5, pp. 1098–1100, 2001.

Résumé

L'étude des mécanismes inter- et intra-cellulaires nécessite d'utiliser des outils d'observation non invasifs pour la cellule, sensibles aux faibles signaux et très résolvents tant spatialement que temporellement. Actuellement, les techniques de microscopie à fluorescence réalisent le meilleur compromis entre ces trois caractéristiques, notamment grâce à l'apparition de caméras ultrasensibles et du 4π -microscope. Néanmoins, la *localisation axiale* de molécules individuelles et la *résolution latérale* des microscopes confocaux doivent être encore améliorées. Le couplage d'un 4π -microscope et d'un interféromètre de Michelson, nous a permis de localiser axialement des luminophores par *interférométrie à faible longueur de cohérence*. Nous avons également proposé une modification des 4π -microscopes afin d'améliorer leur résolution latérale.

Mots-clés : 4π -microscopie, interférométrie à faible longueur de cohérence, super-résolution, localisation axiale, volume de collection, microscopie confocale à fluorescence.

Abstract

Ultra-sensitive, super-resolving and non invasive tools are required for studying the cell machinery at the molecular level. Thanks to the use of ultra-sensitive cameras and to the development of the 4π -microscope, fluorescence microscopy technique is the best tool for this kind of study. Nevertheless, the *axial localization* of single molecules and the *lateral resolution* of the confocal microscopes must be improved. In our optical set-up, a 4π -microscope coupled to a Michelson interferometer allows to determine the axial position of a luminophore by *Partial Coherence Interferometry (PCI)*. We have also proposed a configuration of 4π -microscopes for improving their lateral resolution.

Keywords : 4π -microscopy, Partial Coherence Interferometry, PCI, super-resolution, Axial localization, Molecule Detection Efficiency, Collection Efficiency Function, Fluorescence confocal microscopy.