



# **Méthodes d'augmentation de résolution en microscopie optique exploitant le modelage de faisceau laser et la déconvolution**

**Thèse**

**Louis Thibon**

**Doctorat en biophotonique**  
Philosophiæ doctor (Ph. D.)

Québec, Canada

© Louis Thibon, 2019

**Méthodes d'augmentation de résolution en  
microscopie optique exploitant le modelage de  
faisceau laser et la déconvolution.**

**Thèse**

**Louis Thibon**

Sous la direction de:

Michel Piché, directeur de recherche  
Yves de Koninck, co-directeur de recherche

# Résumé

La microscopie à balayage laser est limitée en résolution par la limite de diffraction de la lumière. Plusieurs méthodes de superrésolution ont été développées depuis les années 90 pour franchir cette limite. Cependant, la superrésolution est souvent obtenue au prix d'une grande complexité (laser de haute puissance pulsé, temps d'acquisition long, fluorophores spécifiques) ainsi que des limitations dans le type d'échantillon observé (observation en surface uniquement). Dans certains cas, comme pour l'illumination structurée et la microscopie SLAM, une amélioration en résolution plus modeste est obtenue, mais avec une complexité et des limites d'utilisation fortement réduites par rapport aux autres méthodes de superrésolution. Les méthodes que nous proposons ici sont des méthodes d'augmentation de résolution qui visent à minimiser les contraintes expérimentales et à garder un maximum des avantages des techniques d'imagerie conventionnelles. Dans les cas que nous avons étudiés, les méthodes proposées sont basées sur la microscopie confocale.

Nous allons montrer dans un premier temps qu'il est possible d'augmenter de 20% la résolution d'un microscope confocal en changeant le faisceau laser utilisé pour l'excitation par un faisceau Bessel-Gauss tout en ayant un sténopé de la bonne taille (soit 1 Airy Unit). Les avantages de la méthode proposée résident dans sa simplicité d'installation et d'utilisation et sa compatibilité avec d'autres méthodes d'augmentation de résolution. Nous avons démontré les capacités d'augmentation de résolution des faisceaux Bessel-Gauss théoriquement puis expérimentalement sur des échantillons de nano-sphères et de tissus biologiques obtenant ainsi une résolution de  $0.39\lambda$ . Nous avons également montré que l'amélioration en résolution des faisceaux Bessel-Gauss donne une analyse statistique de la colocalisation avec un taux plus faible de faux positifs. Nous avons utilisé des faisceaux Bessel-Gauss de différents ordres pour améliorer la méthode de la microscopie SLAM et ainsi obtenir une résolution descendant à  $0.17\lambda$  (90 nm avec une longueur d'onde de 532 nm). La méthode proposée est entièrement basée sur la microscopie confocale et seul un module permettant de changer le faisceau laser doit être ajouté au montage.

Dans un second temps, nous proposons une méthode permettant de bénéficier au maximum des propriétés de la déconvolution pour augmenter la résolution de la microscopie confocale. Pour cela, nous avons utilisé différents modes laser pour l'acquisition d'images et ces images sont uti-

lisées comme données d'entrée pour la déconvolution (avec des mesures des PSF respectives). Les faisceaux laser utilisés apportent ainsi des informations complémentaires à l'algorithme de déconvolution permettant ainsi d'obtenir des images avec une résolution encore meilleure que si une simple déconvolution (utilisant le même algorithme) était utilisée sur l'image confocale. Par la suite, nous avons changé les faisceaux laser par des faisceaux Bessel-Gauss pour augmenter davantage l'efficacité de la déconvolution. Encore une fois, la méthode proposée est entièrement basée sur la microscopie confocale et seul un module permettant de changer le faisceau laser doit être ajouté au montage.

Enfin, nous proposons d'aborder une méthode de reconstruction en trois dimensions par tomographie basée sur des projections obtenues en microscopie à deux photons utilisant les faisceaux Bessel-Gauss. En focalisant des faisceaux Bessel-Gauss à angle en microscopie deux photons, on obtient une série de projections utilisables pour une reconstruction tomographique. Le but est de tester la faisabilité de la méthode qui permettrait de reconstruire un volume, en nécessitant moins d'images que dans le cas d'une acquisition plan par plan, en microscopie deux photons classique.

# Abstract

Laser scanning microscopy is limited in lateral resolution by the diffraction of light. Super-resolution methods have been developed since the 90s to overcome this limitation. However, superresolution is generally achieved at the cost of a greater complexity (high power lasers, very long acquisition times, specific fluorophores) and limitations on the observable samples. In some cases, such as Structured Illumination Microscopy (SIM) and Switching Laser Modes (SLAM), a more modest improvement in resolution is obtained with a reduced complexity and fewer limitations. We propose here methods which improve the resolution while minimizing the experimental constraints and keeping most of the advantages of classical microscopy.

First, we show that we can improve by twenty percent the resolution of confocal microscopy by using Bessel-Gauss beams, and by having the right pinhole size (1 Airy Unit), compared to conventional Gaussian beam based confocal microscopy. The advantages of this strategy include simplicity of installation and use, linear polarization compatibility, possibility to combine it with other resolution enhancement and superresolution strategies. We demonstrate the resolution enhancement capabilities of Bessel-Gauss beams both theoretically and experimentally on nano-spheres and biological tissue samples with a resolution of  $0.39\lambda$ . We achieved these resolutions without any residual artifacts coming from the Bessel-Gauss beam side lobes. We also show that the resolution enhancement of Bessel-Gauss beams leads to a better statistical colocalization analysis with fewer false positive results than when using Gaussian beams. We have also used Bessel-Gauss beams of different orders to further improve the resolution by combining them in SLAM microscopy achieving a resolution of  $0.17\lambda$  (90 nm with a wavelength of 532 nm).

In a second step, we propose a method to improve the resolution of confocal microscopy by combining different laser modes and deconvolution. Two images of the same field are acquired with the confocal microscope using different laser modes and are used as inputs to a deconvolution algorithm. The two laser modes have different Point Spread Functions and thus provide complementary information leading to an image with enhanced resolution compared to using a single confocal image as input to the same deconvolution algorithm. By changing the laser modes to Bessel-Gauss beams, we were able to improve the efficiency of the deconvolution algorithm and to obtain images with a residual Point Spread Function having a

width smaller than 100 nm. The proposed method requires only a few add-ons to the classic confocal or two photon microscopes.

Finally, we propose a three dimensional tomography reconstruction method using Bessel-Gauss beams as projection tools in two-photon microscopy. While focussing Bessel-Gauss beams at an angle in two photon microscopy, we can obtain a series of projections that can be used for tomography reconstruction. The aim is to test the practicality of the methods allowing to reconstruct a volume while using fewer images than plane by plane acquisitions as in classic two-photon microscopy.

# Table des matières

<b>Résumé</b>	<b>iii</b>
<b>Abstract</b>	<b>v</b>
<b>Table des matières</b>	<b>vii</b>
<b>Liste des tableaux</b>	<b>ix</b>
<b>Liste des figures</b>	<b>x</b>
<b>Remerciements</b>	<b>xx</b>
<b>Avant-propos</b>	<b>xxii</b>
<b>Introduction</b>	<b>1</b>
0.1 Contexte biologique et microscopie . . . . .	1
0.2 Méthodes de superrésolution en microscopie optique . . . . .	22
0.3 Microscopie par déconvolution . . . . .	32
0.4 Quelle définition pour la superrésolution ? . . . . .	34
0.5 Comparatif des méthodes de microscopie optique . . . . .	36
0.6 Objectifs de cette thèse . . . . .	44
<b>1 Les faisceaux Bessel-Gauss en microscopie confocale</b>	<b>46</b>
1.1 Les faisceaux Bessel-Gauss et leurs utilisations . . . . .	46
1.2 Formalisme théorique et présentation du montage . . . . .	48
1.3 Focalisation de faisceaux Bessel-Gauss . . . . .	53
1.4 Augmentation de résolution en microscopie confocale . . . . .	58
1.5 Procédure d’alignement . . . . .	59
1.6 Applications et contraintes . . . . .	63
1.7 Discussion . . . . .	69
<b>2 Augmentation de résolution par déconvolution à l’aide de modes laser structurés : D-SLAM</b>	<b>71</b>
2.1 Impact de la PSF sur le procédé de déconvolution . . . . .	71
2.2 Solution Maximum a posteriori (MAP) . . . . .	74
2.3 Caractérisation de l’algorithme et simulations . . . . .	78
2.4 Applications expérimentales . . . . .	80
2.5 Réglage des paramètres de déconvolution . . . . .	85
2.6 Les faisceaux Hermite-Gauss . . . . .	88

2.7	Utilisation des faisceaux Bessel-Gauss . . . . .	94
2.8	Discussion . . . . .	99
<b>3</b>	<b>Reconstruction 3D à partir de projections par faisceaux Bessel-Gauss en microscopie deux photons</b>	<b>102</b>
3.1	La stéréoscopie : point de départ de l'idée . . . . .	102
3.2	Théorie et méthode de tomographie . . . . .	103
3.3	Caractérisation de l'algorithme et simulations . . . . .	109
3.4	Application expérimentale . . . . .	112
3.5	Discussion . . . . .	112
3.6	Ouverture et directions futures . . . . .	114
	<b>Discussion</b>	<b>115</b>
	<b>Conclusion</b>	<b>120</b>
<b>A</b>	<b>Focalisation de faisceaux à proximité d'une interface plane</b>	<b>122</b>
A.1	Description du problème . . . . .	122
A.2	Formalisme théorique . . . . .	123
A.3	Comparaison théorique entre faisceaux gaussiens et Bessel-Gauss . . . . .	126
<b>B</b>	<b>Tests de qualité sur divers axicons</b>	<b>131</b>
B.1	Test de qualité du faisceau Bessel-Gauss formé après l'axicon . . . . .	131
B.2	Test de qualité de l'anneau formé par une lentille placée à une distance focale de l'axicon . . . . .	133
B.3	Mesure de faisceau Bessel-Gauss au point focal de l'objectif . . . . .	135
	<b>Bibliographie</b>	<b>138</b>

# Liste des tableaux

0.7	Microscopies épi-fluorescence, confocale et deux photons . . . . .	40
0.8	Microscopies 4Pi / I5M, TIRF et NSOM . . . . .	40
0.9	Microscopies STED, SMLM et DHM . . . . .	40
0.10	Microscopies SIM et SLAM . . . . .	41
2.1	Tableau récapitulatif de la comparaison entre SLAM et déconvolution sur images simulées . . . . .	81
2.2	Tableau récapitulatif de la comparaison entre les déconvolutions utilisant les faisceaux $TE_{00}$ et $TE_{01}$ ou les faisceaux $J_0$ et $J_1$ sur images simulées . . . . .	96

# Liste des figures

0.1	Système nerveux . . . . .	3
0.2	Le cerveau . . . . .	4
0.3	Les aires du cerveau . . . . .	5
0.4	La colonne vertébrale . . . . .	5
0.5	Le neurone . . . . .	7
0.6	Les types de neurones . . . . .	7
0.7	Les cellules gliales . . . . .	8
0.8	Les synapses . . . . .	9
0.9	Les microscopes historiques . . . . .	11
0.10	Les protéines fluorescentes . . . . .	13
0.11	L'effet confocal . . . . .	17
0.12	Comparaison de la fluorescence au point focal en microscopie 1-photon et 2-photons . . . . .	18
0.13	La tache d'Airy . . . . .	19
0.14	Critère de résolution de Rayleigh . . . . .	19
0.15	Limite de diffraction : onde plane . . . . .	21
0.16	La microscopie 4Pi . . . . .	23
0.17	Microscope de fluorescence par réflexion totale interne : TIRF . . . . .	24
0.18	Microscope optique en champ proche : NSOM . . . . .	25
0.19	La microscopie STED . . . . .	26
0.20	La microscopie par localisation stochastique . . . . .	28
0.21	Schéma simplifié d'un microscope holographique numérique . . . . .	29
0.22	La microscopie SIM . . . . .	31
0.23	Faisceaux laser de la microscopie SLAM . . . . .	31
0.24	Exemples d'application des méthodes de superrésolution optique sur les sous-structures cellulaires . . . . .	42
1.1	Géométrie de focalisation par une lentille aplanétique . . . . .	48
1.2	Simulation numérique de figures d'intensité des faisceaux Bessel-Gauss . . . . .	51
1.3	Schémas du montage . . . . .	53
1.4	Mesures expérimentales comparées aux simulations théoriques des faisceaux Bessel-Gauss . . . . .	54
1.5	Effets du sténopé sur les faisceaux Bessel-Gauss . . . . .	54
1.6	Mesure de PSF du faisceau Bessel-Gauss d'ordre 0 . . . . .	55
1.7	Estimation de la profondeur de champ du faisceau Bessel-Gauss . . . . .	56
1.8	Comparaison de la profondeur de champ entre faisceau gaussien et Bessel-Gauss . . . . .	57
1.9	Mesure de résolution de la microscopie confocale Bessel-Gauss sur nano-sphères . . . . .	58

1.10	Mesure de résolution de la microscopie confocale Bessel-Gauss sur un marquage de microtubules . . . . .	59
1.11	Mesure de résolution de la microscopie confocale Bessel-Gauss sur un marquage de la protéine gephyrin . . . . .	60
1.12	Alignement du faisceau laser entre deux miroirs . . . . .	61
1.13	Calibration du sténopé pour faisceaux gaussien et Bessel-Gauss . . . . .	62
1.14	Étude de colocalisation gephyrin - GAD avec faisceaux gaussien et Bessel-Gauss . . . . .	64
1.15	Méthode SLAM appliquée en microscopie confocale à faisceau Bessel-Gauss sur nano-sphères . . . . .	66
1.16	Méthode SLAM appliquée en microscopie confocale à faisceau Bessel-Gauss sur un marquage de microtubules . . . . .	67
1.17	Comparaison des caractéristiques de photoblanchiment entre faisceaux gaussien et Bessel-Gauss . . . . .	68
2.1	Modules des MTF pour les faisceaux $TEM_{00}$ et $TE_{01}$ . . . . .	72
2.2	Images confocales simulées avec les faisceaux $TEM_{00}$ et $TE_{01}$ . . . . .	73
2.3	Résultats de la déconvolution par filtre de Wiener . . . . .	74
2.4	Comparaison des composantes fréquentielles des résultats de déconvolution par filtre de Wiener . . . . .	75
2.5	Comparaison entre SLAM et déconvolution sur images simulées . . . . .	79
2.6	Profils de la comparaison entre SLAM et déconvolution sur images simulées . . . . .	80
2.7	Comparaison expérimentale entre SLAM et déconvolution sur nano-sphères . . . . .	82
2.8	Profils de la comparaison expérimentale entre SLAM et déconvolution sur nano-sphères . . . . .	82
2.9	Comparaison expérimentale entre SLAM et déconvolution sur marquage de microtubules . . . . .	83
2.10	Comparaison expérimentale entre SLAM et déconvolution sur marquage de la protéine gephyrin . . . . .	84
2.11	Exemples de réglages des paramètres pour la régularisation Tikhonov . . . . .	86
2.12	Exemples de réglages des paramètres pour la régularisation à préservation de bords . . . . .	87
2.13	Exemples de réglages des paramètres pour la régularisation à préservation de bords sur images expérimentales . . . . .	88
2.14	Faisceaux Hermite-Gauss théoriques . . . . .	89
2.15	Comparaison entre SLAM, la déconvolution avec les faisceaux classiques et celle avec les faisceaux Hermite-Gauss sur données simulées . . . . .	90
2.16	Profils de la comparaison entre SLAM, la déconvolution avec les faisceaux classiques et celle avec les faisceaux Hermite-Gauss sur données simulées . . . . .	91
2.17	Schémas de déphasages pour modes Hermite-Gauss . . . . .	92
2.18	PSF des modes Hermite-Gauss . . . . .	92
2.19	Résultats expérimentaux de déconvolution avec les faisceaux Hermite-Gauss . . . . .	93
2.20	Faisceaux $TEM_{00}$ et $TE_{01}$ comparés aux faisceaux Bessel-Gauss d'ordre 0 et 1 . . . . .	94
2.21	Comparaison entre SLAM, la déconvolution avec les faisceaux classiques et celle avec les faisceaux Bessel-Gauss sur données simulées . . . . .	95
2.22	Profils de la comparaison entre SLAM, la déconvolution avec les faisceaux classiques et celle avec les faisceaux Bessel-Gauss sur données simulées . . . . .	95
2.23	Comparaison entre la déconvolution avec les faisceaux classiques et celle avec les faisceaux Bessel-Gauss sur nano-sphères . . . . .	96

2.24	Profils de la comparaison entre la déconvolution avec les faisceaux classiques et celle avec les faisceaux Bessel-Gauss sur nano-sphères . . . . .	97
2.25	Déconvolution avec les faisceaux Bessel-Gauss mis en parallèle avec une image de référence STED . . . . .	98
2.26	Profils de la déconvolution avec les faisceaux Bessel-Gauss mis en parallèle avec le profil d'une image de référence STED . . . . .	98
3.1	Stéré-microscopie Bessel-Gauss . . . . .	103
3.2	Projection et coupe . . . . .	105
3.3	Sinogram . . . . .	106
3.4	Projection et reconstruction par projection inverse . . . . .	107
3.5	Le faisceau Bessel-Gauss en tant que projecteur . . . . .	108
3.6	Le faisceau Bessel-Gauss à angles . . . . .	108
3.7	Faisceau Bessel-Gauss 3D : simulation . . . . .	109
3.8	Simulation des projections avec faisceaux Bessel-Gauss . . . . .	110
3.9	Résultats de reconstruction par rétroprojection et rétroprojection filtrée . . . . .	111
3.10	Exemple de schémas de montage . . . . .	112
3.11	Exemple de schémas de montage . . . . .	113
A.1	Schéma de la focalisation d'un faisceau proche d'une interface . . . . .	122
A.2	Schéma de la focalisation d'un faisceau proche de deux interfaces . . . . .	123
A.3	Schémas des interfaces et notations pour les calculs des coefficients de Fresnel . . . . .	126
B.1	Faisceau gaussien à l'entrée de l'axicon . . . . .	131
B.2	Protocole de test qualité des axicon 1 . . . . .	132
B.3	Faisceau à 3 cm de l'axicon . . . . .	132
B.4	Faisceau à 10 cm de l'axicon . . . . .	133
B.5	Faisceau à 20 cm de l'axicon . . . . .	133
B.6	Protocole de test qualité des axicon 2 . . . . .	134
B.7	Faisceau à 5 cm de la lentille . . . . .	134
B.8	Faisceau à 10 cm de la lentille . . . . .	135
B.9	Faisceau à 15 cm de la lentille . . . . .	135
B.10	Position de la lentille adjointe au sténopé pour chaque axicon . . . . .	136
B.11	Images de nano-sphère pour chaque axicon . . . . .	136

# Liste des abréviations et des symboles

## Abréviations

Laser	Light amplification by stimulated emission of radiation
SLAM	Switching LAsEr Modes
AU	Airy Unit
PSF	Point Spread Function
SIM	Structured Illumination Microscopy
GFP	Green Fluorescent Protein
YFP	Yellow Fluorescent Protein
GCaMP	Green fluorescent protein (GFP), Calmodulin, and M13 protein
ASAP	Accelerated Sensor of Action Potentials
CCD	Charge-Coupled Device
NA	Numerical Aperture
STED	STimulated Emission Depletion
PALM	Photo-Activated Localization Microscopy
STORM	Stochastic Optical Reconstruction Microscopy
FED	Fluorescence Emission Microscopy
CARS	Coherent Anti-Stokes Raman Scattering
TEM	Transverse ElectroMagnetic
TE	Transverse Electric
DPSS	Diode Pumped Solid State
PMT	PhotoMultiplier Tubes
ND	Neutral Density
FWHM	Full Width at Half Maximum
GABA	Gamma-AminoButyric Acid
B-SLAM	Bessel-Gauss beam Switching LAsEr Modes
SNR	Signal to Noise Ratio
MTF	Modulation Transfer Function
MAP	Maximum A Posteriori
PFA	ParaFormAldehyde

HG	Hermite-Gauss
CT	Computerized tomography
PET	Position Emission Tomography
OCT	Optical coherence tomography
ML	Maximul Likelihood
EM	Expected Maximum

## Symboles

$\lambda$	Longueur d'onde dans le vide
-----------	------------------------------

## Introduction

$NA$	Ouverture numérique
$D_{Rayleigh}$	Distance de résolution de Rayleigh
$D_{Abbe}$	Distance de résolution de Abbe
$z$	Coordonnée cartésienne longitudinale (axe optique)
$d_{STED}$	Distance de résolution en microscopie STED
$I_{STED}^{max}$	Intensité maximale d'un faisceau STED
$I_{sat}$	Intensité de saturation des fluorophores en microscopie STED
$p_{fluo}$	Précision sur la position d'une molécule fluorescence localisée en PALM/STORM
$N$	Nombre de photons
$d_{PSF}$	Largeur de la PSF
$S_{fluo}$	Signal de fluorescence émis
$u$	Fréquence spatiale de l'image
$I_0$	Intensité d'illumination en microscopie SIM
$C_{fluo}$	Concentration de molécules fluorescentes dans l'échantillon
$I_{sin}$	Illumination sinusoïdale
$u_0$	Fréquence d'oscillation de l'illumination sinusoïdale
$\delta$	Fonction de Dirac
$e$	Fonction exponentielle
$j$	Unité imaginaire
$\phi$	Phase de l'illumination sinusoïdale
$TEM_{00}$	Faisceau laser transverse électromagnétique d'ordre 0-0 (faisceau Gaussien)
$TE_{01}$	Faisceau laser transverse électrique d'ordre 0-1 (faisceau Laguerre-Gauss)
$I_{SLAM}$	Image de microscopie SLAM
$I_{bright}$	Image confocale avec un faisceau plein classique $TEM_{00}$
$I_{donut}$	Image confocale avec un faisceau "donut" $TE_{01}$

$g$	Facteur de contraste de la microscopie SLAM
$y$	Image de l'objet observé
$h$	PSF du microscope
$x$	Distribution d'intensité de l'objet observé
$n$	Bruit
$k$	Indice du pixel
$*$	Produit de convolution

## Chapitre 1 : Les faisceaux Bessel-Gauss en microscopie confocale

$x, y$	Coordonnées cartésiennes transversales
$z$	Coordonnée cartésienne longitudinale (axe optique)
$\rho, \varphi$	Coordonnées cylindriques transversales dans la région focale
$\phi$	Angle polaire des ondes planes déviées par le système de focalisation
$\theta$	Angle azimutal des ondes planes déviées par le système de focalisation
$\hat{\mathbf{a}}_i$	Vecteur unitaire lié à la coordonnée spatiale $i$
$f$	Distance focale du système de focalisation
$E$	Champ électrique du faisceau
$E_0$	Constante du champ électrique
$\pi$	Constante pi
$\Omega$	Ensemble de l'espace d'intégration
$E_{inf}$	Champ électrique du faisceau réfracté par un système de focalisation (objectif)
$exp$	Fonction exponentielle
$\mathbf{k}$	Vecteur d'onde
$\mathbf{r}$	Vecteur de position
$q$	Facteur d'apodisation d'un système de focalisation
$l_0$	Distribution de l'amplitude réfractée par un système de focalisation
$k_i$	Composante selon la coordonnée spatiale $i$ du vecteur d'onde
$sin, cos$	Fonctions sinus et cosinus
$\theta_{max}$	Angle maximum de focalisation
$n_i$	Indice de réfraction d'un milieu $i$
$k$	Nombre d'onde
$J_m$	Fonction de Bessel d'ordre $m$
$E_i$	Composante selon la coordonnée spatiale $i$ du champ électrique du faisceau
$w$	Largeur d'un faisceau Gaussien
$R$	Rayon de la pupille d'entrée d'un objectif
$\Delta\theta$	Largeur de l'anneau d'un anneau de lumière de profil radial gaussien
$\epsilon_i$	Permittivité d'un milieu $i$
$\epsilon_0$	Permittivité du vide

$\beta$	Angle de déviation d'un axicon
$SNR_{rms}$	Rapport signal à bruit de moyenne quadratique pondérée
$M, N$	Dimension d'une image (en pixel)
$dB$	Décibel
$\log_{10}$	Logarithme de base 10

## Chapitre 2 : Augmentation de résolution par déconvolution à l'aide de modes laser structurés

$\hat{y}$	Transformée de Fourier de l'image de l'objet observé
$\hat{x}$	Transformée de Fourier de l'objet observé
$\hat{f}^{Wiener}$	Transformée de Fourier du filtre de Wiener
$f^{Wiener}$	Filtre de Wiener
$x^{True}$	Distribution d'intensité réelle de l'objet
$x^{Wiener}$	Distribution d'intensité de l'objet retrouvée après filtrage par le filtre de Wiener
$E$	Espérance mathématique
$\hat{h}$	MTF
$\hat{h}^*$	Conjugué complexe de la MTF
$\alpha, \beta$	Paramètres du filtre de Wiener
$\phi_{MAP}$	Densité de probabilité au sens du maximum a posteriori
$\phi_{ML}$	Densité de probabilité au sens du maximum de vraisemblance
$\phi_{ML}$	Densité de probabilité de la régularisation
$x$	Variable de la fonction cout de déconvolution (image déconvoluée)
$H$	Opérateur de convolution par la PSF de l'instrument
$y$	Image mesurée (et donc convoluée par la PSF expérimentale)
$W$	Matrice de variance-covariance
$D$	Opérateur des différences finies
$D^T$	Transposée de l'opérateur des différences finies
$\mu$	Paramètre de la régularisation Tikhonov
$i, j$	Indices des pixels (en deux dimensions)
$\Delta$	Opérateur différentiel
$H^T$	Transposée de l'opérateur de convolution par la PSF de l'instrument
$A$	Matrice symétrique, définie positive de l'équation résolue par les gradients conjugués
$b$	Vecteur de l'équation résolue par les gradients conjugués
$\lambda_0$	Paramètres de la régularisation L2-L1 à préservation de bords
$r$	Indice du pixel
$\nabla$	Opérateur de dérivation Nabla
$\ \cdot\ $	Opérateur de norme absolue
$\theta_r$	Second paramètre de la régularisation L2-L1 à préservation de bords

$\ln$	Logarithme népérien
$\nabla^2$	Opérateur Laplacien
$A$	Amplitude complexe d'une onde
$U_{m,n}$	Amplitude complexe d'un mode Hermite-Gauss d'ordre m,n
$A_{m,n}$	Constante du mode Hermite-Gauss d'ordre m,n
$W_0, w(z)$	Rayon du faisceau Hermite-Gauss
$G_i$	Polynôme de Hermite d'ordre i
$R$	Rayon de courbure du front d'onde
$\zeta$	Phase de Gouy
$\tan$	Fonction tangente
$Z_R$	Distance de Rayleigh
$l$	Épaisseur de la couche d'argent déposée sur les miroirs (modes Hermite-Gauss)

### Chapitre 3 : Reconstruction 3D à partir de projections par faisceaux Bessel-Gauss en microscopie 2-photons

$Rf$	Transformée intégrale de Radon de la fonction f
$L$	Ensemble des lignes de l'espace sur lesquelles la transformée de Radon est prise
$B$	Filtre Butterworth
$u$	Fréquence spatiale
$u_c$	Fréquence de coupure du filtre Butterworth

*À ma famille et mes amis.  
Merci du soutien!*

Restez un instant et  
écoutez-moi...

---

Deckard Cain (1996 - 2012)

# Remerciements

Je souhaiterais d'abord remercier mes directeurs de recherche Michel Piché et Yves de Koninck qui m'ont donné l'opportunité d'intégrer leur équipe de recherche. Cette thèse m'a permis de découvrir de nouveaux horizons en optique et microscopie mais également de faire mon entrée dans le monde de biologie cellulaire avec les neurosciences. En tant qu'ingénieur en électronique et informatique (spécialisé dans le traitement des images) le plongeon en microscopie optique appliquée aux neurosciences a démarré bien haut. C'est grâce à la confiance qu'ils ont placée en moi et en mes travaux que j'ai pu aller si loin.

Mes remerciements aux membres de mon comité d'évaluation Simon Rainville, Pierre Marquet et Frédéric Lesage pour avoir accepté d'évaluer ma thèse. Merci également à Daniel Coté, Paul de Konink et Martin Lévesque pour leurs divers avis, suggestions et conseils.

Un grand Merci à toute l'équipe du laboratoire YDK : Annie Castonguay, Karine Bachand, Mario Méthot, Marc Bergeron, Louis-Etienne Lorenzo, Sylvain Côté, Cyril Bories, Feng Wang, Martin Cottet, Axele Dovonou, Melina Papalampropoulou-Tsiridou, Jimena Perez-Sanchez, Isabel Plasencia, Samuel Ferland, Jonathan Damblon, Iason Keramidis. Merci pour l'accueil chaleureux, les conseils et discussions enrichissantes pour l'avancement de mon projet ainsi que les diverses distractions et activités tout autant bénéfiques.

Merci à Harold Dehez et Gabrielle Thériault pour m'avoir montré les ficelles du monde de la microscopie optique et pour m'avoir guidé lors des premiers développements sur les méthodes présentées dans cette thèse. Merci également à Simon Labrecque, Etienne Labrie-Dion, Cléopha Akitegetse, Alicja Gasecka, vos conseils furent précieux.

Merci à Jacqueline Turmel pour sa guidance dans les différents déboires administratifs ainsi que pour l'organisation de rencontres et rendez-vous avec mes directeurs.

Des remerciements particuliers à mes parents Laurent (Pôpa) et Laurence (Môman), à ma sœur Fanny (et on n'oubliera pas Fiesta non plus :p). Merci également à mes grands parents Mireille et Guy, et Annick et Tony. Bien que loin physiquement vous êtes toujours restés très proches, toujours prêts à m'écouter et me soutenir dans ce long périple.

Merci à tout mes amis et collègues du centre ~~CRIUSMQ~~ CERVO : Martin, Axelle, Jimena,

Yannina, Isabelle, Amalia, Cléopâtre, Alicja, Sarah, Melina, Archana, Cédric, Jonathan, Audrey, Charleen, Aditi, Tushare pour vos soutiens, discussions, soirées et autres distractions bien méritées.

Un grand merci également à mes colocos Axelle, Jimena et Léa, à Yoann, à Martin et Aurélie (sans oublier Anaïs et Justin), pour ces soirées pizza/thaï & jeux toujours autant infinissables. Merci à Mathieu et Aurélie pour de belles virées à Montréal afin de rompre avec la routine du quotidien Québécois.

Merci à Ben, Marco et Cha, votre visite à mes débuts au Québec m'a permis de mieux m'installer et accepter mon expatriation.

Merci aux membres Clan Des Moelleux Pyromanes pour ces petites sessions de partage de sel et de sable : Mr Couuir pilote d'avion (Pieirrick), Oncle Ben expert en corrosion et brûlures (Ben), Le roi méduse à l'appart trop grand (Keurgy), Sabelette (Cam), Mr propre (Loic), Jean-Michel Kangourou (Yannick).

Vive le Sel!

L'homme caribouc.

# Avant-propos

Cette thèse a fait l'objet de plusieurs publications dont le détail est présenté ci-dessous.

Le premier chapitre intitulé "Les faisceaux Bessel-Gauss en microscopie confocale" a fait l'objet d'une publication dans un journal scientifique révisé par les pairs. Cet article a été soumis le 16 Août 2016 et publié dans *Optics Express* le 26 Janvier 2017.

L. Thibon, L. Lorenzo, M. Piché, and Y. De Koninck, "Resolution enhancement in confocal microscopy using Bessel-Gauss beams," *Opt. Express* 25(3), 2162-2177 (2017).

La méthode développée dans ce chapitre a également fait l'objet d'une demande de brevet intitulée "Method and system for improving lateral resolution in optical scanning microscopy" et publiée le 24 Août 2017.

Publication number : WO2017139885 A1  
Publication date : Aug 24, 2017  
Application number : PCT/CA2017/050195  
Filing date : Feb 15, 2017  
Priority date : Feb 16, 2016  
Inventors : Louis THIBON, Koninck Yves De, Michel PICHÉ  
Applicant : UNIVERSITÉ LAVAL

Le second chapitre intitulé "Augmentation de résolution par déconvolution à l'aide de modes laser structurés : D-SLAM" a également fait l'objet d'une publication dans un journal scientifique révisé par les pairs. Cet article a été soumis le 17 Janvier 2018 et publié dans *Optics Express* le 10 Septembre 2018.

L. Thibon, M. Piché, and Y. De Koninck, "Resolution enhancement in laser scanning microscopy with deconvolution switching laser modes (D-SLAM)," *Opt. Express* 26(19), 24881-24903 (2018).

# Introduction

La microscopie optique a toujours été un outil clé dans les domaines de recherche liés à la biologie et l'est d'autant plus aujourd'hui avec la disponibilité des lasers et de systèmes optiques commerciaux abordables. Dans ce document, nous allons présenter des nouvelles méthodes de microscopie optique dans le but d'ajouter aux techniques actuelles et de proposer des alternatives aux méthodes existantes parfois très complexes. Pour vérifier l'efficacité des méthodes proposées nous observerons des échantillons biologiques tests.

Étant donné que les échantillons biologiques montrés dans ce document sont associés au domaine des neurosciences, nous commencerons par en faire un bref aperçu pour bien situer l'échelle des phénomènes observés. Dans la mesure où les méthodes développées s'inscrivent dans le domaine de la microscopie optique, nous présenterons également le développement de la microscopie optique ainsi que les méthodes de pointe disponibles actuellement. C'est pour combler un manque dans l'éventail des méthodes disponibles que les méthodes présentées dans cette thèse ont été développées.

## 0.1 Contexte biologique et microscopie

### 0.1.1 Les neurosciences et le système nerveux

Cette section vise à présenter de manière générale les neurosciences, ainsi que l'anatomie du système nerveux, dans le but de situer correctement les structures biologiques utilisées dans cette thèse afin de démontrer l'efficacité des méthodes de microscopie développées.

#### **Histoire des neurosciences**

Le cerveau humain ayant toujours été un mystère pour l'homme, c'est pourquoi bon nombre de médecins et chercheurs ont voué une partie ou la totalité de leur carrière à tenter de percer les secrets du cerveau. Plus généralement, les études se sont focalisées sur le système nerveux, pour en accroître les connaissances anatomiques ou encore fonctionnelles de ses divers composants.

Il est possible de remonter l'histoire des neurosciences à la Grèce antique, au 3<sup>e</sup> siècle avant notre ère où le médecin grec Hérophile de Chalcédoine contribua fortement à l'avancée des

neurosciences de l'époque, notamment sur la morphologie du cerveau qu'il considérait être le centre de l'être et le siège des émotions. Il fut l'un des premiers à remarquer la présence de nerfs reliant les différentes parties du corps à la moelle épinière. Dans la même lignée et suite aux multiples découvertes des médecins lui succédant, Claude Galien, un médecin grec de l'Empire romain du 2e siècle, considérait le cerveau comme une partie de l'âme responsable des sensations et des commandes motrices. Il considérait également les ventricules cérébraux comme des zones centrales permettant la circulation de ce qu'il appelait les « humeurs aqueuses ».

Durant le Moyen Âge, étant donné que les dissections étaient proscrites, il n'y a pas eu d'évolution des connaissances sur le cerveau. Il fallut attendre la Renaissance (15e et 16e siècles) pour que certains, comme Leonard de Vinci et André Vessale, reprennent les dissections et attribuent plus d'importance à la matière grise. Ces nouvelles théories remettent en cause la théorie précédente des « humeurs aqueuses » pourtant soutenue par René Descartes qui considérait le cerveau comme une machine hydraulique. C'est vers la fin du 18e siècle, après les découvertes sur l'électricité, que la vision du cerveau changea de nouveau pour une transmission nerveuse basée sur la transmission électrique.

C'est au 19e siècle que Franz Joseph Gall développa la phrénologie [1,2] qui donna une importance particulière aux diverses circonvolutions de la surface du cerveau. Cette théorie aurait permis de déchiffrer des traits personnels en fonction de la forme de la boîte crânienne. Bien qu'erronée, cette théorie fut la première à lier diverses localisations à des fonctions spécifiques. Ce furent finalement les travaux de Paul Broca, au 19e siècle, et ses découvertes notamment sur le centre de la parole [3] (« aire de Broca ») qui confirmèrent que certaines zones du cerveau ont des fonctions bien spécifiques. Au 19e siècle Camillo Golgi [4] et Santiago Raymon y Cajal [5] développèrent une méthode permettant de ne marquer qu'un faible nombre de neurones dans le système nerveux central, leur permettant de nombreuses découvertes qui leur valurent le prix Nobel de médecine et physiologie en 1906. Ce furent les premières observations de neurones dans le système nerveux central.

De nombreuses découvertes se sont ensuite succédées au 20e siècle. On peut citer Wilder Penfield et Theodore Brown Rasmussen et leurs homoncules moteur et sensitif décrivant les répartitions sensorielles et motrices des différents membres à la surface du cortex cérébral et qui publièrent en 1950 *The Cerebral Cortex of Man* [6]. On peut également citer Gerald Edelman et son darwinisme neural [7]. Au 21e siècle, de grands projets de cartographie du cerveau ont vu le jour, comme le « Human Connectome project [8] » ou le « Human Brain Project [9] ».

## **Anatomie du cerveau et de la moelle épinière**

Le système nerveux est une machinerie complexe du corps humain que l'on peut diviser en deux grandes parties : le système nerveux central comprenant le cerveau et la moelle épinière, et le système nerveux périphérique qui comporte les nerfs reliant le système nerveux central

au reste du corps humain (fig. 0.1-*A*) (peau, organes internes, muscles, etc...). Le système nerveux central contient deux types de zones : la matière grise et la matière blanche (fig. 0.1-*B*). La matière grise correspond aux zones où les corps cellulaires des cellules neuronales sont présents dans le système nerveux central. La matière blanche, quant à elle, contient les longues projections de ces cellules neuronales dédiées aux grandes voies de communication du système nerveux central. La totalité du système nerveux central est entourée par une couche appelée les méninges qui servent d'enveloppe de protection structurée en trois sous-couches : la dure-mère, la couche la plus extérieure, l'arachnoïde et la pie-mère qui épouse presque parfaitement les formes du cerveau et de la moelle épinière (fig. 0.1-*C*). Le système nerveux périphérique peut être divisé en deux sous-catégories : le système nerveux somatique et le système nerveux végétatif. Le système nerveux somatique comprend les nerfs sensoriels et moteurs qui permettent une interaction avec l'environnement extérieur au corps humain. Le système nerveux végétatif regroupe, quant à lui, les nerfs permettant une régulation des fonctions vitales autonomes comme la respiration, le rythme cardiaque ou encore la digestion ou la régulation hormonale.

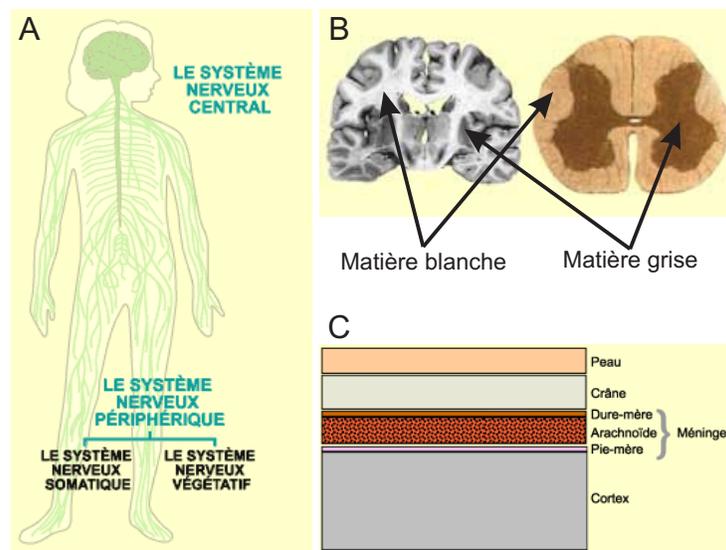


FIGURE 0.1 – *A/* Système nerveux central et périphérique. *B/* Matière blanche et matière grise à gauche sur une coupe de cerveau et à droite sur une coupe de moelle épinière. *C/* Vue schématique de l'organisation des méninges au niveau de la boîte crânienne. Figures adaptées de [10].

Outre la différenciation entre matière grise et matière blanche, le cerveau est séparé latéralement en deux hémisphères (fig. 0.2-*A*). On notera tout particulièrement que le cortex est découpé en quatre parties anatomiques différentes appelées des lobes (fig. 0.2-*B*), ainsi que quatre ventricules qui permettent la production et la circulation de liquide céphalo-rachidien (fig. 0.2-*C*). C'est dans ce liquide que baignent le cerveau et la moelle épinière. Il sert à la fois de protection et de système de transport des déchets. On sait aujourd'hui que chacune de ces

zones est associée à une ou plusieurs fonctions spécifiques.

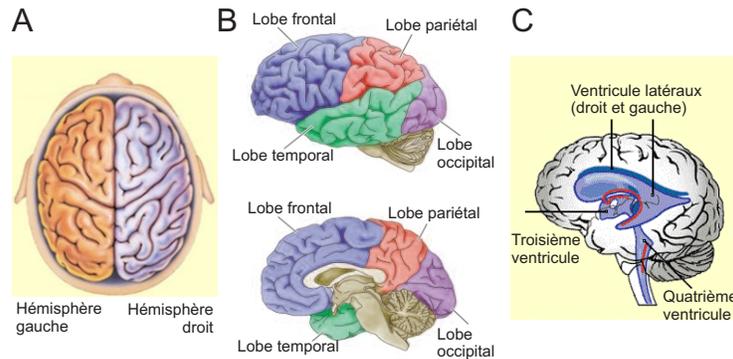


FIGURE 0.2 – *A/* Les deux hémisphères cérébraux. *B/* Les quatre lobes du cerveau représentés en haut à la surface et en bas sur une coupe. *C/* Les ventricules cérébraux affichés en transparence dans un cerveau. Figures adaptées de [10] et [11].

On peut délimiter plusieurs zones distinctes ayant chacune des fonctions spécifiques (fig. 0.3-*A*). On peut notamment remarquer les zones du cortex consacrées au langage : l'aire de Broca dans le lobe frontal (fig. 0.3-*B*). Les aires liées aux perceptions sensorielles se situent dans le cortex somatosensoriel localisé dans le lobe pariétal, ainsi que le cortex moteur situé dans le lobe frontal. Les aires consacrées à l'audition se situent dans le lobe temporal ou encore l'aire visuelle dans le lobe occipital. Le cervelet est principalement associé aux coordinations motrices et à l'équilibre. L'hippocampe serait principalement lié à la mémoire et aux souvenirs. Le thalamus est une zone centrale servant, entre autres, de relais entre l'information sensorielle et le cortex et les autres parties du cerveau. L'hypothalamus a plus un rôle de maintien de l'équilibre interne du corps humain ; il influence l'appétit, les émotions et participe à la régulation hormonale. Le tronc cérébral permet de réguler, entre autres, le sommeil et les fonctions telles que la respiration et le rythme cardiaque ainsi que certains réflexes.

La deuxième grande partie du système nerveux central, la moelle épinière, est divisée en 31 sections réparties en quatre grands tronçons : cervicale, thoracique, lombaire et sacrée (fig. 0.4-*A*). Chaque paire de nerfs de chaque section innerve une zone spécifique du corps humain (fig. 0.4-*B*). La tête, les épaules et une partie des bras sont innervées par les paires cervicales, la totalité du torse jusqu'au bassin par les paires thoraciques, le bas des hanches et la majorité des jambes par les paires lombaires et les parties génitales et les pieds par les paires sacrées.

De chacune de ces sections partent des paires de nerfs spinaux qui font le lien entre les systèmes nerveux central et périphérique. La moelle épinière sert principalement de relais entre les voies sensorielles et motrices et les centres du cerveau. Elle est également le siège d'un certain nombre de voies réflexes fonctionnant indépendamment du cerveau, tel que le réflexe d'extension du genou. La moelle épinière joue également un rôle important dans la transmission et l'intégration des signaux liés à la perception de la douleur.

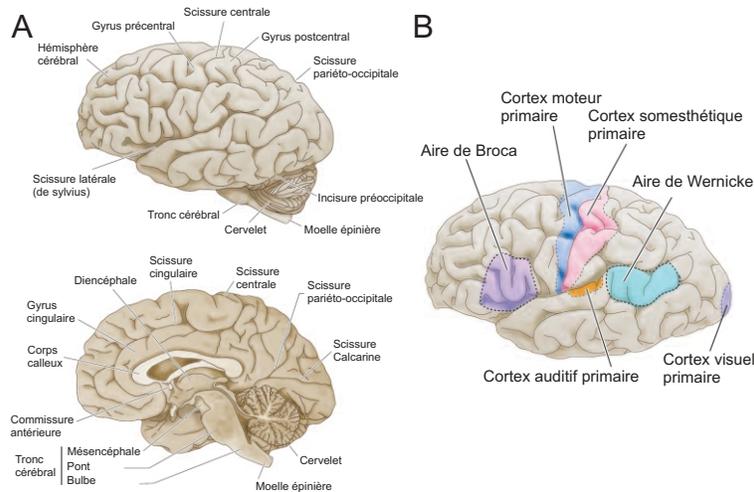


FIGURE 0.3 – Exemple de délimitation de quelques aires du cerveau. Figure adaptée de [11].

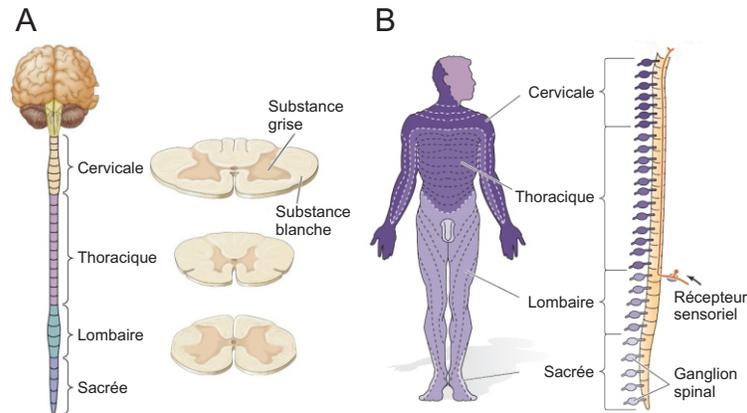


FIGURE 0.4 – A/ Les quatre principaux tronçons de la moelle épinière avec à droite trois coupes des tronçons cervicaux, thoraciques et lombaires pour illustrer les différences de répartition entre matière blanche et matière grise le long de la moelle épinière. B/ Dermatome représentant l'innervation du corps humain par chacune des 31 sections de la moelle épinière. Figures adaptées de [11].

### 0.1.2 Les neurosciences à l'échelle microscopique et la neurobiologie cellulaire

Maintenant que le système nerveux est présenté dans son ensemble, nous allons présenter ses composants cellulaires internes. Ce sont ces composants qui nous intéressent ici, car ce sont des structures charnières dans l'étude des neurosciences et l'utilisation de microscopes est nécessaire pour pouvoir les observer.

## Anatomie des neurones et des cellules gliales

On peut diviser les cellules du cerveau en deux familles principales, les cellules neurales appelées neurones et les cellules gliales parfois appelées névroglies. On dénombre aujourd'hui plusieurs centaines de milliards de cellules neurales et gliales ; ces dernières seraient, en fait, une dizaine de fois plus nombreuses que les neurones. La structure cellulaire des neurones est semblable à celle de la plupart des cellules dans le sens où elle contient les organites classiquement présents dans les cellules animales, tels que le noyau, les mitochondries, l'appareil de Golgi, les réticulums endoplasmiques et un cytosquelette interne (microtubules, microfilaments et neurofilaments), comme présenté à la fig. 0.5. Ce qui différencie les neurones des autres cellules est leur capacité à transmettre l'information, de manière chimique ou électrique, vers d'autres neurones de manière unidirectionnelle. Pour ce faire, les neurones ont une structure générale bien particulière ; on peut distinguer trois parties majeures, le corps cellulaire ou soma, les dendrites et l'axone. Les dendrites forment la partie du neurone chargée de recevoir l'information transmise par d'autres neurones et de l'acheminer jusqu'au soma. Le corps cellulaire contient toute la machinerie cellulaire classique et intègre les signaux reçus par les dendrites pour ensuite les transmettre à l'axone. L'axone est chargé de la transmission de l'information vers d'autres neurones ; cette transmission se fait par génération d'un potentiel d'action qui va perturber l'équilibre électrochimique de l'axone et se propager, comme une réaction en chaîne, vers l'extrémité de l'axone. Dans les neurones, le rôle du cytosquelette est également important, car il permet, en plus de son rôle structurel, de servir de guide pour le transport de certaines vésicules et protéines.

Pour un certain nombre de neurones, l'axone est recouvert d'une couche isolante appelée gaine de myéline ; cette couche est formée par un certain type de cellules gliales : les oligodendrocytes (dans le système nerveux central) ou les cellules de Schwann (dans le système nerveux périphérique). La zone de transmission électrique ou chimique entre deux neurones est appelée la synapse.

Il existe un grand nombre de types de neurones, ayant des formes différentes, des compositions différentes ou des rôles différents (voir fig. 0.6). Certaines cellules ont des arbres dendritiques très développés comme les cellules de Purkinje, d'autres beaucoup plus restreints comme, par exemple, certaines cellules de la rétine. Il existe plusieurs méthodes pour classer les neurones ; ils peuvent être classés selon leur nombre de neurites (dendrites et axone), par la forme de leur arbre dendritique, la longueur de l'axone ou le type de transmission utilisé à la synapse ainsi que le type de connexions synaptiques qu'ils possèdent (neurone-neurone, neurone-muscle, neurone-capillaires).

En ce qui concerne les cellules gliales, elles servent de supports aux neurones dans la transmission synaptique, de système immunitaire cérébral ou encore de recycleur permettant de garder un milieu extracellulaire stable. Elles sont divisées en trois types : les astrocytes, les oligodendrocytes et cellules de Schwann et les microglies. Les astrocytes participent à la ré-

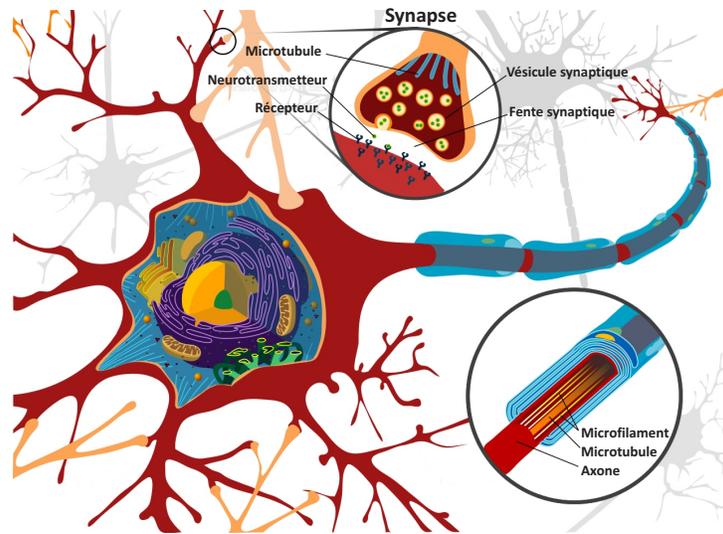


FIGURE 0.5 – Schéma simplifié montrant l'anatomie interne et externe d'un neurone. Figure modifiée de [12].

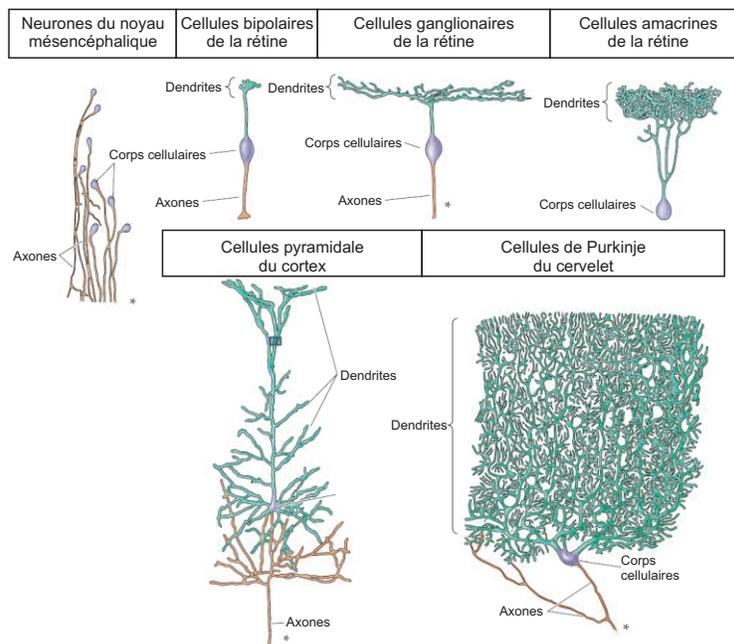


FIGURE 0.6 – Schéma simplifié montrant différents types de neurones ayant des formes et structures différentes. L'astérisque indique que l'axone est bien plus grand que ce qui est représenté. Figure adaptée de [11].

gulation de la composition du milieu extracellulaire, sont actifs dans certaines transmissions synaptiques et sont des cellules essentielles de la barrière hémato-encéphalique. Les oligodendrocytes et cellules de Schwann sont des cellules formant des couches de membrane (la myéline) autour des axones de certains neurones. Elles forment ainsi une couche isolante accélérant la

transmission de l'influx nerveux (potentiel d'action) par une conduction saltatoire de nœud de Ranvier à nœud de Ranvier (un nœud de Ranvier correspond à la zone de jonction faiblement myélinisée entre deux cellules de Schwann ou bras d'oligodendrocytes). Les oligodendrocytes sont présents uniquement dans le système nerveux central alors que les cellules de Schwann sont confinées au système nerveux périphérique. Les microglies sont en quelque sorte les phagocytes du système nerveux ; elles jouent le rôle de poubelles et sont cruciales en tant que constituant majeur du système immunitaire du système nerveux. Un autre type de cellules est également présent dans le système nerveux central, les cellules épendymaires. Bien que ce ne soient pas des cellules neuronales, elles tapissent les ventricules cérébraux formant ainsi les plexus choroïdiens qui sécrètent le liquide céphalorachidien.

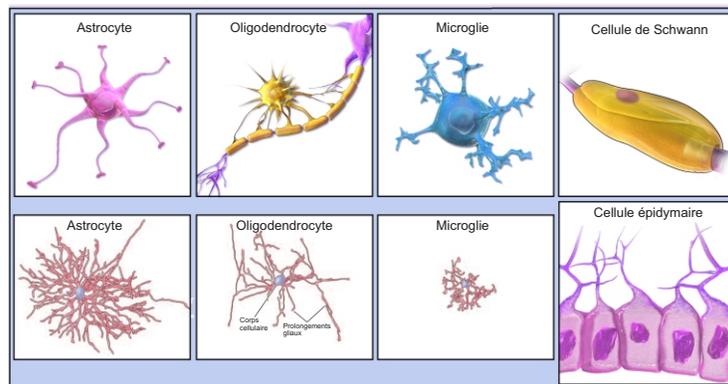


FIGURE 0.7 – Figure montrant les différents types de cellules gliales. Figure adaptée de [11,13].

L'utilisation de la microscopie optique classique est souvent suffisante pour étudier ces structures dans leur ensemble, mais dans le cas de certaines sous-structures les microscopes optiques classiques peuvent ne plus être suffisants. Ce sont ces sous-structures qui seront la cible de notre étude et c'est pour l'observation de structures à ces dimensions que la pertinence des méthodes développées durant cette thèse prend tout son sens.

### Les synapses

On appelle synapse la zone où l'influx nerveux passe d'une cellule neuronale à une autre. On distingue deux types de synapses : les synapses électriques où les ions responsables de l'influx nerveux passent d'une cellule à l'autre par des canaux au niveau de la jonction, et les synapses chimiques où l'influx nerveux est transformé en signal chimique transmis par des neurotransmetteurs relâchés dans la fente synaptique et captés par des récepteurs du côté postsynaptique (voir fig. 0.8). Dans les synapses électriques, les canaux ioniques sont présents de part et d'autre des deux membranes cellulaires et forment des voies de passage passives (jonction Gap) pour les différents ions responsables du potentiel d'action. Les synapses électriques sont en minorité dans le système nerveux et permettent une transmission extrêmement rapide d'une cellule à l'autre en plus de pouvoir être bidirectionnelles. Un des rôles principaux

des synapses électriques est la synchronisation de l'activité électrique parmi certaines populations de cellules neurales. Contrairement aux synapses électriques, les synapses chimiques ne forment pas de contact direct entre les deux cellules neurales ; l'espace entre les deux cellules est appelé la fente synaptique. Lorsque le potentiel d'action arrive à la synapse, la cellule présynaptique libère des neurotransmetteurs en fusionnant des vésicules synaptiques avec la membrane cellulaire donnant sur la fente synaptique. Ces neurotransmetteurs se retrouvent lâchés dans le milieu extracellulaire et seront captés par des récepteurs spécifiques disposés à la surface de la membrane de la cellule postsynaptique. Ces récepteurs vont ensuite s'activer et déclencher une signalisation en chaîne qui peut se rendre jusqu'au corps cellulaire de la cellule postsynaptique. La majorité des récepteurs synaptiques vont, entre autres, s'ouvrir pour permettre le passage d'ions à travers la membrane et ainsi déclencher la chaîne de signalisation intracellulaire dans les dendrites.

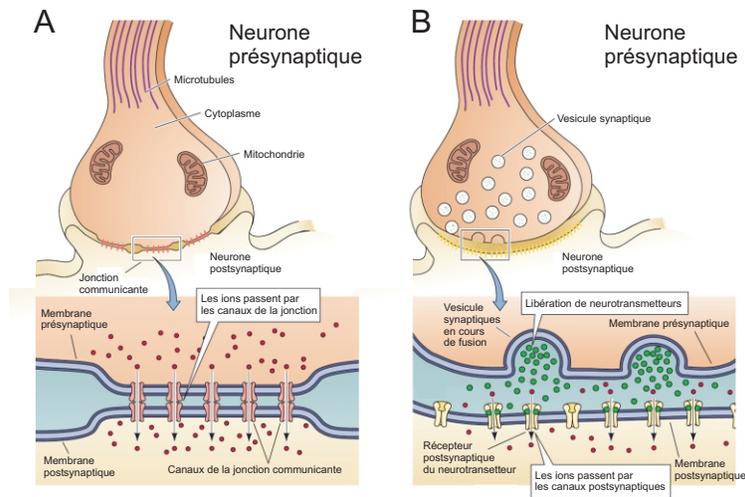


FIGURE 0.8 – Figure montrant les deux types de synapses et détaillant leur fonctionnement. *A/* Une synapse électrique. *B/* Une synapse chimique. Figure adaptée de [11].

Il est bon de remarquer que les neurones ne sont pas les seules cellules impliquées dans les synapses. En effet, les astrocytes entourent fréquemment les synapses entre deux neurones et peuvent jouer un rôle plus important que le simple maintien des concentrations ioniques extracellulaires et le recyclage des neurotransmetteurs. Ce type de synapse est souvent appelé une synapse tripartite.

Un des phénomènes importants du système nerveux, permettant un ajustement de la force des différentes synapses et jouant un rôle dans l'apprentissage et la mémoire, est le phénomène de plasticité synaptique. Cette plasticité synaptique permet de changer la force des connexions et de remodeler une partie du système nerveux sur des périodes allant de la milliseconde à plusieurs mois. Les mécanismes moléculaires responsables de ces changements vont d'un changement d'expression de certaines protéines à la synapse (récepteurs, kinases, etc...) à un

changement dans l'expression de certains gènes en passant par l'augmentation du nombre de vésicules libérées. Ces changements peuvent être plus structurels et modifier l'arbre dendritique, ou les terminaisons axonales, pour ajouter ou retirer des terminaisons.

De par la taille des structures et éléments composant une synapse (quelques dizaines de nanomètres), il est difficile d'obtenir des images suffisamment détaillées de synapses en utilisant des microscopes optiques classiques compatibles avec l'observation de tissus vivants. Dans le cas, par exemple, d'étude de protéines dans les régions pré- et post-synaptiques, les chercheurs ont eu recours à des méthodes de microscopie optique avancées (dites de superrésolution 0.2) pour étudier les distributions de ces protéines à l'échelle du nanomètre [14].

### Les besoins en microscopes

Du fait de la taille de ces différentes structures et l'échelle de ces phénomènes (de quelques micromètres à quelques nanomètres), les scientifiques ont eu besoin d'un certain nombre d'outils de pointe. L'un des outils les plus utilisés est le microscope. La microscopie a permis d'obtenir un aperçu structurel des différentes cellules du système nerveux, mais également d'en étudier le fonctionnement. Dans les prochaines sections, nous proposons un aperçu historique et fonctionnel de ces techniques de microscopie.

#### 0.1.3 La microscopie optique

Nous présentons ici un bref aperçu de l'histoire de la microscopie optique ainsi que de l'utilisation de la fluorescence, car notre étude se base sur l'utilisation et l'amélioration d'un des types de microscopes optiques utilisant la fluorescence comme moyen de contraste. Il existe également un autre type de microscopie permettant d'obtenir des images d'une très grande précision : la microscopie électronique. Nous ne nous attarderons pas sur la microscopie électronique ici, un paragraphe lui étant tout de même dédié en section 0.1.6. Pour plus de détails sur les origines de la microscopie optique se référer à [15].

#### Histoire de la microscopie optique

L'outil d'observation principal de l'homme a longtemps été l'œil humain, qui fonctionne comme une lentille et permet d'imager le monde extérieur sur la rétine. Il ne permet cependant pas d'observer des structures et phénomènes aussi petits que les cellules neurales et la transmission synaptique. En effet, la séparation angulaire de l'œil humain (en approximant la pupille par une ouverture de 2 mm de diamètre) étant d'environ  $\theta_{min} = \frac{1.22\lambda}{D} = 1.22 \frac{600nm}{2mm} \approx 0.37$  mrad à une longueur d'onde de 600 nm, le pouvoir de séparation de l'œil est d'environ  $d = L \tan(\theta_{min}) \approx 0.1$  mm à une distance de  $L = 30$  cm.

Bien que les Grecs et les Romains de l'antiquité connaissaient déjà les lentilles et leurs utilisations, l'une des premières utilisations de lentilles de verre comme outil de grossissement ne remonte qu'au 10e siècle où des lentilles dites de Visby furent utilisées en joaillerie ou pour la

lecture. C'est à cette même époque que le premier traité d'optique connu fut écrit par Abu Ali al-Hasan ibn al-Hasan ibn al-Haytham : *Kitab al-Manazir* [16].

C'est en 1609 que Galileo Galilei propose l'un des premiers microscopes à plusieurs lentilles, l'occholino (fig. 0.9-*A*), qu'il mit en place en ayant l'idée de retourner le télescope pour obtenir un système permettant de grossir les petits objets. Il publia, en 1623, *Il Saggiatore* dans lequel il proposa une première version de la méthode scientifique et décrivit également son occholino. On attribue également la découverte du microscope aux opticiens hollandais Hans et Zacharias Janssen qui auraient fabriqué leur premier microscope vers 1590 (fig. 0.9-*B*). Vers la fin du 17e siècle, Christiaan Huygens proposa un autre microscope à deux lentilles (fig. 0.9-*C*) et, en 1675, le drapier hollandais Antony Van Leeuwenhoek utilisa un système à une lentille ayant un grossissement particulièrement élevé (X270) pour observer la qualité de ses tissus (fig. 0.9-*D*). Il l'utilisa plus tard en application à la biologie et découvrit notamment les protozoaires et les spermatozoïdes.

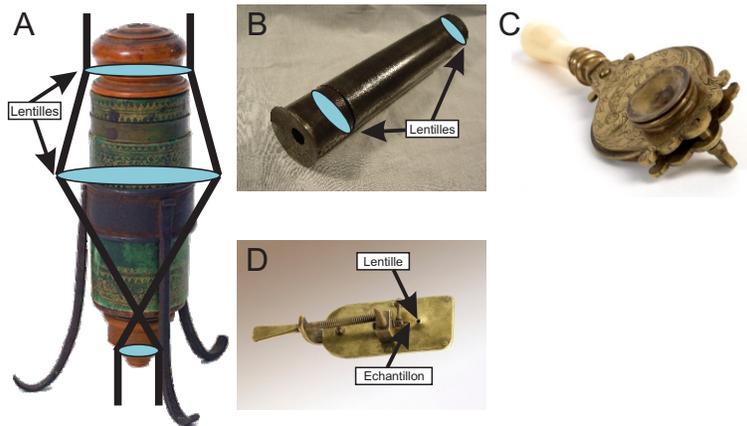


FIGURE 0.9 – Figure montrant en *A/* une photo (modifiée) de l'occholino (musée Galileo de Florence). *B/* Photo du microscope d'Antony Van Leeuwenhoek. Image modifiée du Wild Wide World museum. *C/* Photo du microscope du Huygens. Image du musée des Confluences (Lyon - France). *D/* Microscope tel que proposé par Hans et Zacharias Janssen. Image du National Museum of Health and Medicine network (Silver Spring, MD).

Il fallut cependant attendre 1893 pour qu'August Köhler invente une méthode permettant une illumination uniforme de l'échantillon. Mais le problème de la microscopie optique en biologie reste entier : le manque de contraste. Ce problème sera partiellement résolu dans les années 1953-1955 par le physicien néerlandais Frits Zernike qui reçut, en 1953, le prix Nobel de physique pour son microscope par contraste de phase [17] permettant d'obtenir un bien meilleur contraste en microscopie optique. Une autre option pour augmenter le contraste fut la microscopie à contraste interférentiel proposée en 1955, par Georges Nomarski [18]. Cependant, la solution la plus utilisée pour obtenir un bon contraste et une bonne spécificité en microscopie optique est l'utilisation de molécules fluorescentes.

Étant donné l'importance de la fluorescence en microscopie optique, il est judicieux de présenter sa découverte et son arrivée en microscopie.

### **Histoire de la fluorescence**

En 1565, le botaniste espagnol Nicolás Monardes découvrit que le bois d'un arbre médicinal du Mexique colorait l'eau en bleu. Plusieurs descriptions de ce bois se succédèrent et plusieurs traductions furent proposées jusqu'à ce qu'un prêtre jésuite allemand, Athanasius Kircher, décrive plus en détail les propriétés optiques de l'eau infusée par ce bois, nommée par la suite *Lignum Nephriticum*. La lumière traversant le liquide apparaissait jaune et celle réfléchiée en bleue. Ce n'est que récemment que plusieurs molécules fluorescentes furent extraites de ce bois.

En 1603, Vincenzo Casciarolo découvrit une roche qui, après cuisson, émettait de la lumière bleue-violette dans le noir. En 1612, Galileo Galilei se pencha également sur l'émission de lumière de cette roche. En 1664, Robert Boyle reprit des recherches sur le bois *Lignum Nephriticum* et conclut que la lumière donnée à l'eau provenait d'une essence contenue dans le bois. En 1833, Sir David Brewster étudia et décrivit les propriétés fluorescentes de la chlorophylle. En 1852, George Gabriel Stokes publia son traité décrivant, entre autres, la « réflexion dispersive » (ancien nom de la fluorescence) [19]. Il étudia les phénomènes de fluorescence et remarqua que la fluorescence est caractérisée par une longueur d'onde plus élevée que la lumière d'excitation. Ce phénomène est aujourd'hui appelé *déplacement de Stokes*. En 1875, Eugen Cornelius Joseph von Lommel supposa qu'une substance doit d'abord absorber de la lumière avant de la ré-émettre comme fluorescence.

C'est en 1871, qu'Adolph Von Baeyer synthétisa la *Fluorescine* et reçut, en 1905, un prix Nobel pour ses découvertes sur les colorants. Par la suite, bon nombre de composants fluorescents furent créés et c'est en 1887, que K. Noack publia un livre listant pas moins de 660 de ces composants ordonnés selon leur couleur de fluorescence. L'une des premières applications de la fluorescence fut proposée par F. Goppelsröder en 1867, l'analyse « Fluoreszenz ». En 1933, Aleksander Jablonski proposa pour la première fois l'utilisation de diagrammes pour décrire le processus d'absorption et d'émission de la fluorescence et les différents états de la molécule [20].

### **L'arrivée de la fluorescence en microscopie optique**

La fluorescence fut introduite en microscopie optique pour permettre un plus grand contraste et ainsi gagner en spécificité sur les structures observées. La première utilisation de la fluorescence en microscopie remonte en 1911-1913, où Otto Heimstädt et Heinrich Lehmann utilisèrent l'autofluorescence de plantes et de bactéries pour leur microscope. Avant cette invention, la fluorescence était tout de même déjà utilisée pour certains marquages en histologie et biologie cellulaire. Ce n'est qu'à partir des années 1940, qu'Albert Coons développa une technique permettant de marquer des anticorps avec des fluorophores créant ainsi l'immunofluorescence. La microscopie de fluorescence fit un autre bond, en 1962, lorsque Osamu Shimomura décou-

vrit la « green fluorescent protein (GFP) » [21] qui est issue de la méduse *Aequorea victoria* (Fig 0.10-*A*). Il permit le développement et la synthèse de cette protéine. Cette découverte de la GFP permit par la suite à d'autres biochimistes de faire évoluer les protéines fluorescentes, comme Roger Y. Tsien qui mit au point plusieurs versions dérivées de la GFP pour d'autres couleurs en 1995 (Fig 0.10-*B*). Roger Y. Tsien, Osamu Shimomura et Martin Chalfie reçurent le prix Nobel de chimie, en 2008, pour leurs découvertes sur les protéines fluorescentes. Pour plus de détails sur la GFP, ses variantes et ses applications, se référer à [22]. Pour plus de détails sur l'évolution de la fluorescence et de la microscopie de fluorescence, se référer à [23,24].

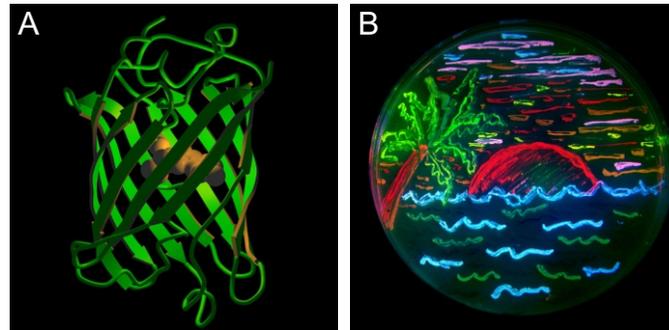


FIGURE 0.10 – *A/* Image de la structure protéinique de la GFP. *B/* Image d'une plage dessinée avec des bactéries exprimant divers dérivés de la GFP. Images modifiées de [25].

### Les différents types de marqueurs fluorescents

Il existe aujourd'hui un grand nombre de marqueurs fluorescents permettant un marquage spécifique de bon nombre d'éléments biologiques. Parmi ces marqueurs, on retrouve les protéines fluorescentes telles que la GFP et ses dérivés (CFP, YFP, ect...), différents types de marqueurs organiques tels que DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) ou les Alexa Fluora, des molécules autofluorescentes, des marqueurs de concentration ionique tel que GCaMP (un indicateur calcique) ou de pH tels que pHred ou pHrodo, des indicateurs de potentiel comme ASAP (Accelerated Sensor of Action Potentials) et enfin des points quantiques.

Une fois le fluorophore sélectionné, plusieurs techniques sont disponibles pour marquer les protéines ou zones d'intérêt dans l'échantillon biologique. Il est possible de faire fabriquer une protéine fluorescente par la cellule par encodage génétique de la séquence de la protéine fluorescente et d'injecter le matériel génétique nécessaire par transfection. La transfection peut s'effectuer par électroporation, lipofection, microinjection ou encore par injection de virus. Il est également possible d'utiliser des techniques d'immunofluorescence pour aller accrocher la molécule fluorescente à la structure d'intérêt à l'aide d'anticorps spécifiques reconnaissant la structure en question. Plusieurs marquages peuvent être effectués simultanément sur le même échantillon, permettant ainsi d'étudier plusieurs processus ainsi que leurs interactions. Il est cependant nécessaire de bien choisir ces molécules fluorescentes pour éviter tout marquage redondant faute de quoi, on perdrait ainsi la spécificité donnée par la fluorescence.

Depuis, les marqueurs fluorescents n'ont cessé d'être au cœur de nombreuses recherches, que ce soit pour augmenter leur efficacité, leur stabilité, leur luminosité ou pour leur ajouter des propriétés spécifiques comme la possibilité de les activer et désactiver à souhait. Toutes ces découvertes sur les molécules fluorescentes ont permis à la microscopie optique de gagner en spécificité, contraste et fonctionnalité lorsqu'elle est combinée à l'utilisation de marqueurs fluorescents.

### **Avancées et innovations récentes en microscopie liées à la fluorescence**

L'arrivée de la fluorescence en microscopie optique a permis la création et le développement de nombreuses méthodes et techniques, notamment dans le domaine biomédical. La microscopie multi-photons, introduite en 1990, permet de réduire la phototoxicité de l'imagerie et réussit à pénétrer plus profondément les tissus permettant ainsi l'imagerie 3D de grands volumes. La microscopie par imagerie de temps de vie de fluorescence (FLIM) est un autre exemple et est particulièrement utilisée en neurosciences du fait de la forte dispersion causée par les tissus cérébraux. La microscopie FLIM est souvent couplée avec les techniques de FRET (Forster resonance energy transfer) pour étudier les interactions moléculaires. Pour plus de détails sur les avancées récentes en microscopie se référer à [26].

#### **0.1.4 Les LASERs : « Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation »**

Étant donné que la microscopie optique utilise souvent des marqueurs fluorescents comme agent de contraste, il est nécessaire de bien contrôler la longueur d'onde de la lumière utilisée pour exciter les molécules fluorescentes. Le meilleur moyen de contrôler cette longueur d'onde avec précision est d'utiliser des lasers. C'est pourquoi nous proposons un court rappel historique sur le développement des lasers. Pour plus de détails se référer à [27].

#### **Origine historique des lasers**

Les lasers trouvent leur origine dans la découverte de Max Planck sur le quantum d'énergie élémentaire qui permit de comprendre la nature corpusculaire de la lumière. Il en reçut le Prix Nobel de physique en 1918. En s'inspirant de ces découvertes, en 1917, Albert Einstein théorisa l'existence de l'émission stimulée (principe de base de tout laser).

Ce n'est qu'en 1951 que Charles Hard Townes conçut la première version du maser : « microwave amplification by stimulated emission of radiation » (ancêtre du laser) qu'il réalisa expérimentalement, en 1954, avec l'aide d'Herbert J. Zeiger et James P. Gordon. Il démontra ainsi les prédictions d'Einstein sur l'émission stimulée en produisant environ 10 nW à une longueur d'onde de 1 cm. En 1955, Nikolai G. Basov et Alexander M. Prokhorov proposèrent pour la première fois une méthode de pompage (negative absorption). Charles Hard Townes, Nikolai G. Basov et Alexander M. Prokhorov reçurent le prix Nobel de physique en 1964 pour

leurs travaux sur les masers. Alfred Kastler obtient, en 1966, le prix Nobel de physique pour ses travaux sur le pompage optique.

En 1957, Charles Hard Townes dessina les premières esquisses du maser optique que Gordon Gould nommera plus tard dans ses notes laser (première mention de cet acronyme). Il publia ses recherches sur les masers optiques et infra-rouges avec Arthur L. Schawlow en 1958. En 1959, Gordon Gould déposa une demande de brevet liée au laser, mais le brevet sera attribué, en 1960, à Charles Hard Townes et à Arthur L. Schawlow pour le maser optique, dorénavant renommé laser. S'ensuivit une longue dispute autour des brevets liés à l'invention du laser, le brevet initial déposé aux États-Unis d'Amérique resta attribué à Charles Hard Townes et à Arthur L. Schawlow. Cependant, après de longues années de procédures judiciaires, Gordon Gould put déposer un grand nombre de brevets liés au développement des lasers, dont le brevet sur le pompage optique. C'est en 1960 que Theodore H. Maiman construisit le premier laser fonctionnel et la commercialisation des lasers commença en 1961.

La première utilisation du laser dans le domaine médical eut lieu, en 1961, pour détruire une tumeur rétinienne.

Nombre de développements ont suivi pour améliorer, notamment, la puissance et les gammes de longueur d'onde des lasers. On pourra noter le premier laser à modes synchronisés rapporté par Logan E. Hargrove, Richard L. Fork et M. A. Pollack en 1964 [28], l'invention du laser CO<sub>2</sub> par Kumar Patel, en 1964, ou encore le développement du premier laser titan-saphir, en 1982, permettant de générer des impulsions laser ultra brèves (de l'ordre de quelques femtoseconde).

Les découvertes sur les lasers ont notamment permis l'apparition des CD (Compact Disc) en 1982 et ont permis la construction d'interféromètres géants (LIGO) qui ont détecté des ondes gravitationnelles en 2015 et 2017. De nombreux développements dans les domaines de la microscopie optique, notamment en fluorescence, ont également pu voir le jour grâce à ces avancées sur la technologie laser.

### **0.1.5 La microscopie optique et la limite de diffraction**

Pour bien comprendre l'étude présentée dans ce document, il est nécessaire d'appréhender les limites de la microscopie optique, et particulièrement la limite de résolution imposée par la diffraction de la lumière. Étant donné que ce travail de thèse se consacre à l'amélioration de la résolution en microscopie optique, il est indispensable de saisir d'où vient cette limite de résolution.

#### **Microscope en épi-fluorescence**

Le microscope en fluorescence le plus simple et le plus utilisé est le microscope par épi-fluorescence qui utilise une illumination uniforme de l'échantillon (dite illumination de Köhler) pour exciter simultanément la totalité des molécules fluorescentes dans le champ de vue du

microscope. L'image est ensuite relayée vers des oculaires ou vers un détecteur (comme une caméra CCD) et peut être enregistrée numériquement. Ce type de microscope a pour avantage d'être simple d'utilisation, de permettre des acquisitions rapides pour des études de processus dynamiques et d'observer simultanément plusieurs marquages, à condition que les spectres des protéines fluorescentes ne se chevauchent pas. L'inconvénient majeur de ce type de microscope est le manque de sectionnement optique : la totalité des molécules fluorescentes de l'échantillon est illuminée, y compris les zones hors foyer (hors de la zone où la mise au point a été effectuée). Ce manque de sectionnement optique a pour conséquence de détériorer l'image en ajoutant des structures complètement hors foyer (et donc floues) à l'image obtenue de la zone d'intérêt, qui est elle au foyer.

Pour pallier ce problème, un autre type de microscopie optique a été inventé : la microscopie confocale.

### **Concept de base de la microscopie confocale.**

La microscopie confocale est une technique de microscopie par balayage laser souvent employée en fluorescence et proposée pour la première fois, en 1961, par Marvin Minsky [29] (fig. 0.11). La technique consiste à balayer un échantillon avec une source laser pour ensuite récupérer le signal et reconstruire une image point par point. La force de cette technique est la présence d'un sténopé, une fine ouverture circulaire placée dans le plan image juste avant le détecteur. Ce sténopé a pour effet de filtrer la fluorescence émise au-dessus et au-dessous du plan focal, ce qui diminue grandement le signal de fond. Ce sténopé permet aussi de réduire la profondeur de champ du microscope, ce qui a pour effet de réduire l'épaisseur de la zone observée et donc d'avoir une meilleure résolution axiale. Cela permet d'obtenir des images en trois dimensions (en imageant plan par plan) ayant un bien meilleur contraste et rapport signal à bruit par rapport aux microscopes par épi-fluorescence.

### **La microscopie à excitation deux photons.**

Un autre moyen d'obtenir un sectionnement optique et de diminuer le signal de fond est l'utilisation de l'effet d'absorption multiphotonique (deux dans ce cas) en microscopie de fluorescence à balayage laser. Ce système de microscopie est appelé microscopie à deux photons. En fluorescence normale, la molécule fluorescente passe de son état fondamental à un état excité en absorbant un photon à une longueur d'onde possédant la quantité d'énergie requise. Il est également possible que la molécule fluorescente absorbe deux photons de longueur d'onde plus élevée, possédant chacun la moitié de l'énergie nécessaire à cette molécule pour passer à l'état excité. Ces deux photons doivent arriver dans une fenêtre temporelle extrêmement courte. C'est pourquoi cet effet a d'abord été prédit théoriquement [30] et n'a pu être démontré expérimentalement qu'après la découverte des impulsions laser brèves. Cela a permis d'avoir une densité de photons suffisante pour que cet effet ait lieu [31,32].

Le sectionnement optique de la microscopie à deux photons avec balayage laser est dû à la

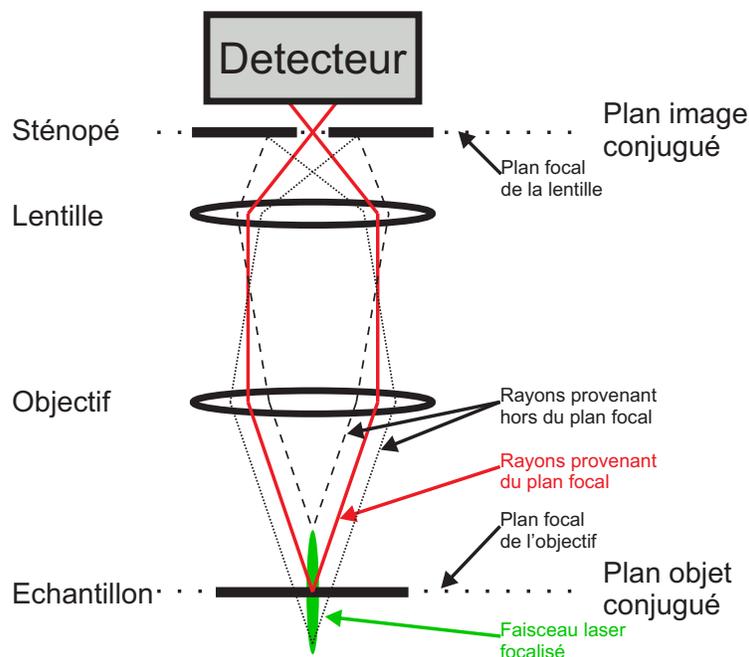


FIGURE 0.11 – Diagramme simplifié montrant l'effet du sténopé sur le sectionnement optique d'un microscope confocal. La lumière provenant des plans en dessus et en dessous du plan focal n'est pas collimatée correctement par l'objectif et se retrouve donc mal focalisée par la lentille précédant le sténopé. Cette lentille qui a pour but de focaliser la lumière du plan focal, permet au sténopé de filtrer la lumière provenant des autres plans, lumière qui ne franchit plus le sténopé puisqu'elle n'est plus focalisée en son centre.

densité de photons nécessaire au fonctionnement de l'effet non linéaire d'absorption à deux photons. En effet, puisque deux photons doivent arriver presque simultanément sur la molécule fluorescente, seule une zone restreinte autour du point focal possède la densité de photons nécessaire pour que ce phénomène ait lieu (voir fig. 0.12).

### Les applications laser en microscopie optique

Puisque la microscopie par fluorescence requiert des sources de lumière intense et presque monochromatique, l'arrivée des lasers a évidemment permis une importante évolution des méthodes et techniques dans le domaine de la microscopie optique par fluorescence. On pourra parler du premier microscope confocal à balayage laser décrit, en 1969, par M. David Egger et Paul Davidovits [34] ou encore du microscope par excitation à deux photons breveté, en 1990, par Winfried Denk et James Strickler. On remarquera également les applications à la génération de seconde harmonique intégrée pour la première fois dans un microscope par Robert Hellwarth et Paul Christensen en 1974 [35] ainsi que la microscopie CARS (Coherent anti-Stokes Raman spectroscopy) utilisant deux lasers émettant à deux longueurs d'onde différentes pour générer et mesurer un signal [36,37]. Dans les développements récents on peut citer la microscopie STED (STimulated Emission Depletion [38]), la microscopie holographique

## Fluorescence created by a Gaussian beam

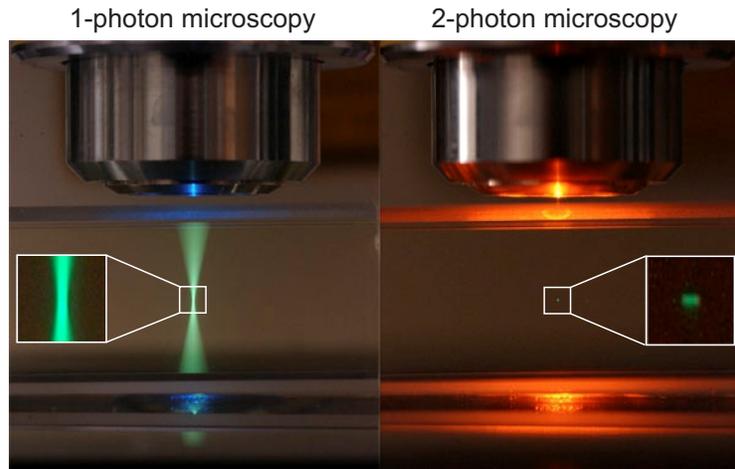


FIGURE 0.12 – Comparaison de la fluorescence au point focal en microscopie 1-photon et 2-photons. Dans les deux cas, un faisceau gaussien est focalisé dans un milieu fluorescent. À gauche, en fluorescence 1-photon, on remarque que beaucoup de fluorescence est générée hors du point focal. À droite, en fluorescence 2-photons, seul le point focal émet de la fluorescence (image adaptée de [33])

(DHM : Digital Holographic Microscopy [39]) ou encore l'optogénétique [40], trois méthodes nécessitant encore une fois l'utilisation de laser pour leur bon fonctionnement.

### La limite de diffraction en microscopie optique.

La microscopie par balayage laser (confocale ou deux photons) a cependant ses limites, une des plus contraignantes étant la limite en résolution appelée « limite de la diffraction ». Cette limite est également présente en microscopie en épi-fluorescence et elle est due au comportement de la lumière à de très petites échelles spatiales. À cause du phénomène de diffraction de la lumière, il n'est pas possible de focaliser un faisceau laser plus petit qu'une certaine taille. Cette taille dépend de la longueur d'onde utilisée et des optiques du microscope. Dans le cas de la microscopie confocale, et pour observer des tissus biologiques, les longueurs d'onde d'excitation se situent la plupart du temps dans le domaine du visible (400 nm - 800 nm). Dans le cas d'une longueur d'onde de 400 nm, la taille limite du faisceau laser au point focal, formant ce que l'on appelle une tache d'Airy (fig. 0.13), s'élève à environ 200 nm de largeur à mi-hauteur au niveau du lobe central.

### Les différents critères de résolution.

Lorsque l'on parle de limite de diffraction, on fait souvent référence à la résolution maximale que l'on peut obtenir avec un microscope confocal, étant donné ses optiques et la longueur d'onde utilisée, et donc la largeur minimale de son point focal. Il existe cependant, plusieurs critères permettant d'évaluer la résolution d'un microscope, le critère de Rayleigh, le critère

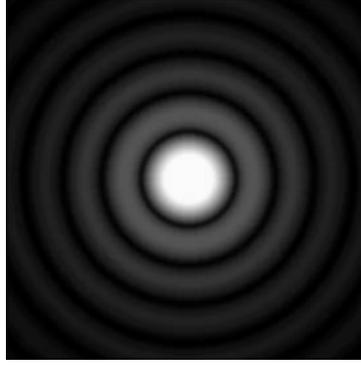


FIGURE 0.13 – Distribution d'intensité d'une tache d'Airy.

d'Abbe ou encore des approches vectorielles pour calculer la forme des faisceaux laser au point focal.

Le critère de Rayleigh est issu de l'optique paraxiale, appelée aussi approximation de Fresnel, où il est considéré que la focale de la lentille est beaucoup plus grande que les dimensions du système : largeur de la lentille et zone d'intérêt dans le plan focal. À partir de cette approximation, on définit la résolution selon le critère de Rayleigh comme la capacité du système à distinguer deux objets ponctuels de manière à ce que le maximum de la tache de diffraction du premier objet coïncide avec le premier zéro de celle du deuxième (fig. 0.14). Lorsque la tache de diffraction est une tache d'Airy, la distance minimum entre ces deux points pour qu'ils puissent être résolus est :

$$D_{\text{Rayleigh}} = 1.22 \frac{\lambda}{2 \text{NA}}, \quad (1)$$

où  $\lambda$  est la longueur d'onde et NA l'ouverture numérique de l'objectif. Avec deux sources à cette distance, on les distingue correctement avec un contraste d'environ 25% (fig. 0.14-C), ce qui correspond à un minimum d'intensité entre les deux sources à 73% du maximum.

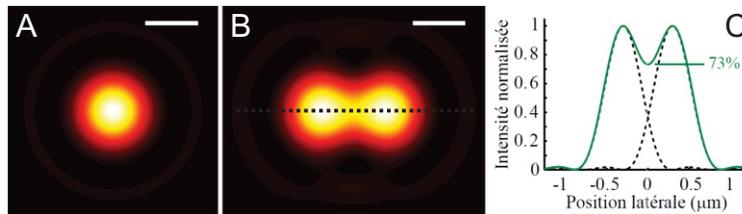


FIGURE 0.14 – *A/* Profils d'intensité de la tache d'Airy donnés par une onde plane focalisée par un objectif d'ouverture numérique  $\text{NA} = 0.5$ . *B/* Image de deux objets ponctuels positionnés à la distance  $D_{\text{Rayleigh}}$ . *C/* Profils d'intensité pris sur la ligne en pointillée en *B/* ; le contraste obtenu est de 73%. Barre d'échelle : 200 nm. Image modifiée de [41]

Un autre critère de résolution similaire à celui de Rayleigh serait le critère limite de Sparrow qui donne, comme résolution, la distance à laquelle deux objets ponctuels imagés ne montrent

aucun trou entre les deux objets (contraste de 0%).

Le critère d'Abbe considère l'échantillon comme une structure périodique et définit la limite de résolution comme la plus petite période détectable. Il ne fait aucune supposition sur les dimensions du système et ne dépend donc pas de l'approximation paraxiale. Dans le cas d'un microscope confocal avec un objectif d'ouverture numérique NA, on obtient comme distance de résolution :

$$D_{\text{Abbe}} = \frac{\lambda}{2NA}, \quad (2)$$

où  $\lambda$  est la longueur d'onde.

Une autre méthode qui permet de calculer précisément la tache de diffraction du faisceau laser au point focal est l'analyse vectorielle de Richards et Wolf. Cette méthode permet de calculer les composantes du champ électrique (et magnétique) du faisceau laser au point focal et de simuler précisément la distribution d'intensité de la tache de diffraction au point focal. Cette méthode ne donne pas de définition de la résolution en tant que telle, mais permet d'avoir une estimation plus précise de la tache de diffraction au point focal dans le régime non paraxial, sans supposer de périodicité dans l'objet observé et en prenant en compte la polarisation de la lumière. Nous utiliserons cette méthode plus loin dans le manuscrit pour obtenir un résultat théorique de nos faisceaux laser au point focal et nous y expliquerons la méthode plus en détail.

Pour une analyse plus complète de la théorie de la diffraction de la lumière, notamment les critères de Rayleigh et d'Abbe, voir [41,42]).

### Sur la limite de diffraction.

En réalité, la limite de diffraction ultime serait plus de l'ordre de  $\frac{\lambda}{4}$ . Prenons l'exemple de deux ondes planes monochromatiques de longueur d'onde  $\lambda$  se propageant en sens opposé selon un axe optique (axe  $z$ ). Si l'on observe la distribution d'intensité de la figure d'interférence entre ces deux ondes planes selon l'axe  $z$ , on obtient des oscillations de demi-période  $\frac{\lambda}{2}$ . Si l'on mesure maintenant la largeur à mi-hauteur de ces demi-périodes, on trouve une valeur de  $\frac{\lambda}{4}$ ; cf fig. 0.15.

Il est bon de noter cependant que de telles ondes ont un support infini, et donc une énergie infinie, et ne sont par conséquent pas réalisables expérimentalement. De plus, il est impossible d'isoler une unique demi-période de largeur à mi-hauteur  $\frac{\lambda}{4}$ . Pour que ces demi-périodes soient si fines, il est nécessaire que la distance d'interférence soit très grande (par rapport à la longueur d'onde). Enfin, ces oscillations ne sont présentes que selon un axe de direction donné (ici  $z$ ) et nécessitent deux ondes en contre propagation, donc avec une ouverture de 180 deg. C'est pour cela que, bien que les lois de la diffraction elles-mêmes autorisent des structures de largeur à mi-hauteur de  $\frac{\lambda}{4}$ , il est difficile de les utiliser telles quelles en microscopie optique pour augmenter la résolution de manière isotropique.

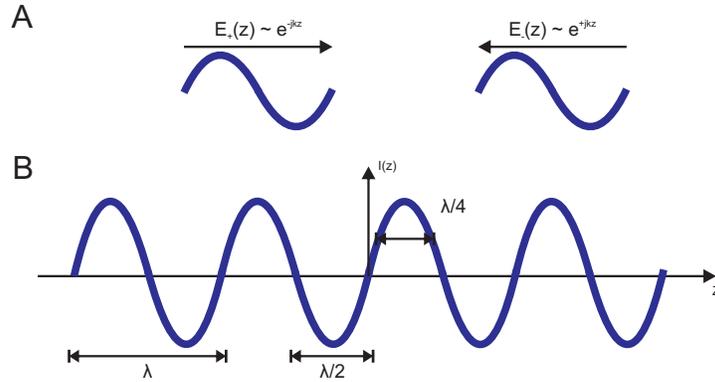


FIGURE 0.15 – *A/* Deux ondes planes se propageant en direction opposées. *B/* Vision schématique de la distribution d'intensité de la figure d'interférence entre ces deux ondes planes selon l'axe  $z$ .

Certains ont utilisé ce phénomène pour augmenter la résolution axiale de la microscopie optique. La microscopie par onde stationnaire (Standing Wave fluorescence Microscopy, SWFM) fut proposée pour la première fois en 1993 [43]. Un autre type de microscopie utilise également un principe similaire : la microscopie 4Pi [44, 45].

### La superrésolution.

La microscopie optique est souvent utilisée pour observer le monde du vivant (biologie, neurobiologie, etc...) car elle est considérée comme une méthode d'observation non-invasive. De plus, le développement de lasers de haute performance (bande spectrale étroite, divergence faible) et de marqueurs fluorescents offre de nombreuses possibilités sur le type de structures observables. Cependant, la limite de la diffraction de la lumière restreint fortement la taille minimale des structures et objets observables. En effet, des structures telles que les vésicules synaptiques (40–60  $nm$  de diamètre), les microfilaments ( $\approx 10$   $nm$  de diamètre) et microtubules ( $\approx 25$   $nm$  de diamètre) ainsi que les différents récepteurs synaptiques (nicotinic acetylcholine receptors  $\approx 10$   $nm$ ) sont de taille bien inférieure à la résolution atteinte en microscopie optique conventionnelle ( $\approx 200$   $nm$ ). Un des grands enjeux de la microscopie optique actuelle est donc de franchir cette limite de diffraction. Plusieurs méthodes de superrésolution existent déjà et chacune a ses propres avantages et inconvénients.

#### 0.1.6 La microscopie électronique

La microscopie électronique est une méthode de microscopie utilisée dans la recherche biomédicale qui permet d'obtenir des images de très haute résolution (inférieure au nanomètre).

Un microscope électronique utilise les interactions électrons-matière pour produire une image, contrairement à un microscope optique qui se base sur les interactions photons-matière. L'avantage d'utiliser des électrons par rapport aux photons est que la longueur d'onde d'un électron

est environ 100 000 fois plus courte que celle d'un photon de lumière visible. Cette différence de longueur d'onde permet aux microscopes électroniques d'atteindre des résolutions des centaines de fois inférieures à celles des meilleurs microscopes optiques classiques. Certains ont même réussi à descendre à des résolutions de l'ordre de 50 pm [46, 47]. De plus de récentes avancées ont permis d'obtenir des images de microscopie électronique à plusieurs couleurs [48].

Cependant, les limites de la microscopie électronique restent de taille, surtout lorsqu'il s'agit d'observer des échantillons biologiques. Effectivement, la préparation des échantillons est longue et complexe, nécessitant une déshydratation complète des tissus ou différents types de fixation chimique. De plus, les échantillons doivent être observés dans une chambre à vide, ce qui limite grandement les possibilités d'observation de tissus vivants. Il existe un type de microscope électronique permettant d'imager des échantillons en milieu liquide, mais les résolutions obtenues sont souvent bien inférieures [49].

Étant donné les limitations, contraintes d'utilisation et la complexité d'un microscope électronique, nous nous concentrerons sur les méthodes de microscopie optique et les techniques de superrésolution développées à partir de microscopes optiques.

## 0.2 Méthodes de superrésolution en microscopie optique

L'existence et la compréhension de la limite de diffraction en microscopie optique ne sont pas récentes. De nombreux chercheurs et ingénieurs ont déjà travaillé à améliorer la microscopie optique classique (on entendra par la microscopie par épi-fluorescence ou confocale) dans le but de dépasser ou contourner cette limite. Cette section présente les méthodes existantes permettant de contourner ou de dépasser la limite de résolution en microscopie optique imposée par la diffraction de la lumière. Bien comprendre le contexte actuel en microscopie optique nous a permis d'identifier un manque dans le panel de méthodes existantes. C'est ce manque que nous souhaitons combler avec les méthodes d'augmentation de résolution développées dans cette thèse.

Il est important de noter que le prix Nobel de chimie de 2014 a été attribué à Éric Betzig, Stefan Hell et William Moerner pour le développement de méthodes de superrésolution basées sur l'activation et l'inactivation de molécules fluorescentes. Pour plus de détails concernant les méthodes de superrésolution et leurs applications, se référer aux publications [50–78].

### 0.2.1 Microscopie 4Pi / I5M

Le principe de base de la microscopie 4Pi est d'illuminer l'échantillon avec deux objectifs opposés. Les deux objectifs sont alignés pour que leurs points focaux coïncident. Les deux excitations focalisées produisent des interférences constructives et destructives permettant de diminuer la largeur axiale de la PSF d'excitation. Une illumination par de la lumière cohérente

étant nécessaire pour que ces interférences aient lieu, des lasers sont donc souvent utilisés. Le point focal ainsi produit est ensuite balayé dans l'échantillon, de la même manière qu'un microscope confocal, et la lumière transmise, ou émise, est collectée par les deux objectifs avant d'être acheminée au détecteur. La microscopie 4Pi permet une augmentation de la résolution axiale d'un facteur  $\approx 4$  par rapport à la microscopie confocale classique [79], menant des résolutions axiales de l'ordre de la centaine de nanomètres [80].

La figure 0.16 montre un schéma simplifié d'un microscope 4Pi.

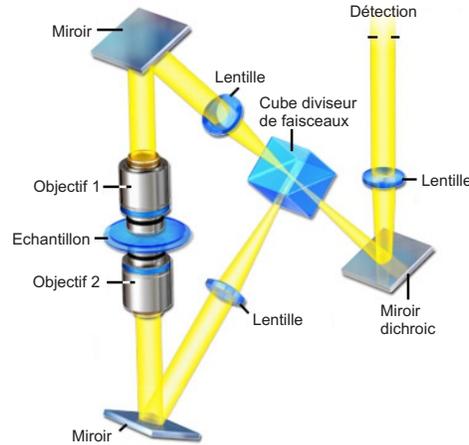


FIGURE 0.16 – Schéma simplifié d'un microscope 4Pi. Image modifiée de [81].

Le concept de la microscopie I5M [82, 83] est en soi très similaire à celui de la microscopie 4Pi, mais est basé sur une illumination plein champ. La lumière cohérente de la microscopie 4Pi est remplacée par une lumière incohérente. L'intensité au plan focal générée par les interférences entre les illuminations des deux objectifs forme un plan d'illumination homogène avec une intensité qui décroît radialement jusqu'à être constante. Le signal est ensuite collecté par les deux objectifs et transmis jusqu'à une caméra.

Dans les deux cas, microscopie 4Pi et microscopie I5M, une étape de traitement d'images par déconvolution est souvent nécessaire pour éliminer les lobes secondaires présents selon la direction axiale de la PSF. Pour plus de détails, ainsi qu'une comparaison des deux méthodes, se référer à [84].

### 0.2.2 Microscope de fluorescence par réflexion totale interne : TIRF

La microscopie de fluorescence par réflexion totale interne utilise le principe d'ondes évanescentes pour n'exciter que les molécules fluorescentes qui sont les plus proches de l'interface entre la lamelle et l'échantillon. Ce principe a été développé pour la première fois par E.J. Ambrose en 1956 [85].

Pour pouvoir générer un front d'onde évanescente dans l'échantillon, l'illumination incidente

doit être totalement réfléchi au niveau de l'interface lamelle-échantillon. Pour cette raison, la microscopie TIRF utilise un faisceau d'excitation laser injecté à partir d'une position décentrée sur l'objectif, ce qui focalisera le faisceau avec un fort angle d'incidence. Si le faisceau injecté est suffisamment décentré, l'angle sera suffisant pour que la réflexion totale ait lieu, créant ainsi une onde évanescente de l'autre côté de l'interface lamelle-échantillon.

Le champ électrique de cette onde évanescente décroît exponentiellement avec sa propagation, ce qui permet à la microscopie TIRF d'avoir une pénétration dans l'échantillon d'environ 100 nm seulement. Cela donne à la microscopie TIRF une profondeur de champ bien inférieure à celle dictée par les lois de la diffraction pour la microscopie optique classique (qui est d'environ  $1\ \mu\text{m}$ ), bien que l'observation soit restreinte à une zone proche de la lamelle d'environ 100 nm de profondeur. La figure 0.17 présente le schéma de principe de la microscopie TIRF ainsi qu'une variante avec angle variable, et donc pas de réflexion totale, proposant une profondeur de champ ajustable.

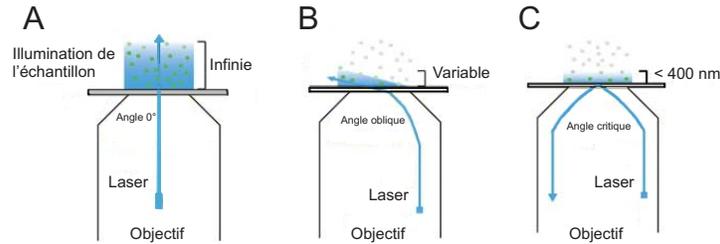


FIGURE 0.17 – Schéma simplifié du principe de la microscopie TIRF. *A/* Microscopie en épifluorescente. *B/* Microscopie à angle variable. *C/* Microscopie TIRF. Image modifiée de [86].

### 0.2.3 Microscope optique en champ proche : NSOM

La microscopie optique en champ proche utilise, elle aussi, le concept d'ondes évanescentes pour obtenir une image ayant une résolution dépassant celle de la microscopie optique classique. En microscopie optique en champ proche, l'échantillon est balayé par une très petite ouverture par laquelle est injecté le faisceau d'excitation. À la sortie de cette ouverture, une onde évanescente est générée en champ proche sur une distance bien inférieure à la longueur d'onde, dépendant de la largeur de l'ouverture utilisée. La lumière émise par l'échantillon est ensuite collectée soit par un objectif de l'autre côté de l'échantillon, soit par la même ouverture utilisée pour l'excitation. L'image est ensuite construite point par point en balayant l'échantillon. Le premier à avoir proposé d'utiliser ce type de méthode fut Edward Hutchinson Syngé en 1928 [87]. Cette méthode fut démontrée expérimentalement pour la première fois en 1972 [88]. Aujourd'hui, la microscopie en champ proche utilise une sonde semblable à une fibre optique pour aller balayer l'échantillon à quelques nanomètres de distance, permettant d'obtenir une résolution transversale allant jusqu'à la dizaine de nanomètres et une résolution axiale de quelques nanomètres [89–92]. La microscopie NSOM est également utilisée en

spectroscopie [90,91].

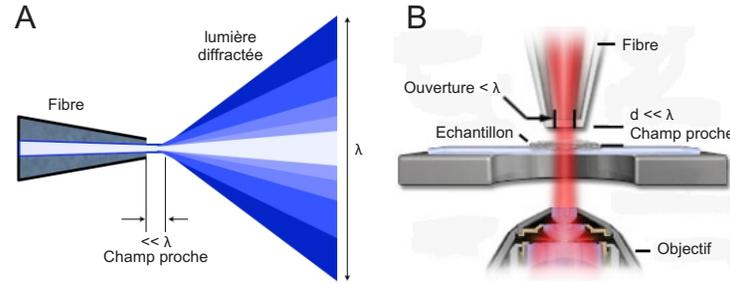


FIGURE 0.18 – Schéma simplifié du principe de la microscopie NSOM. *A/* Schéma simplifié montrant la zone de champ proche juste à la pointe de la fibre. *B/* Schéma d'un système de microscopie NSOM montrant la fibre d'excitation positionnée pour exciter l'échantillon en champ proche ainsi que l'objectif de collection. Image modifiée de [86].

#### 0.2.4 Microscopie de fluorescence avec déplétion par émission stimulée : STED

La microscopie de fluorescence avec déplétion par émission stimulée [38] est une des méthodes de superrésolution les plus connues. Cette technique est basée sur la microscopie par balayage laser et utilise deux faisceaux laser pulsés et synchronisés, un pour exciter et un autre pour stimuler l'émission. Le laser d'excitation est un faisceau gaussien classique alors que le laser d'émission stimulée est un faisceau en forme de beignet qui possède un trou d'intensité en son centre. Ce dernier sera appelé faisceau sombre. Le but de la microscopie STED est de ne conserver que l'émission des molécules fluorescentes situées au centre du volume focal.

Le principe de cette technique est d'abord d'exciter les molécules fluorescentes avec le laser d'excitation (comme en confocal) puis de forcer l'émission des molécules fluorescentes avec le faisceau sombre juste après, avant que les molécules fluorescentes n'aient eu le temps d'émettre spontanément. L'émission stimulée par le faisceau sombre se fait à la même longueur d'onde que ce dernier (640 nm par exemple). Du fait de la forme des deux faisceaux, seules les molécules situées au centre du faisceau sombre pourront émettre de manière spontanée et donc être visibles.

Un point important du STED est la synchronisation des signaux. Les deux faisceaux doivent être pulsés et le faisceau sombre doit arriver juste après le faisceau brillant, avant que les molécules n'aient le temps d'émettre de manière spontanée. C'est cette synchronisation qui permet au STED de ne garder l'émission que dans la partie centrale du faisceau « donut », partie qui ne reçoit pas assez d'intensité pour que l'émission stimulée se produise.

La résolution d'un microscope STED est définie par la puissance du faisceau sombre. Plus la puissance est élevée, plus les molécules proches du centre auront une grande probabilité de se

désexciter par émission stimulée. Une formule permettant de calculer la résolution théorique d'un microscope STED, pour une intensité de faisceau sombre donnée, a été proposée par S. W. Hell [93]. Cette formule prédit une résolution donnée par :

$$d_{\text{STED}} = \frac{\lambda}{2\text{NA} \sqrt{1 + \frac{I_{\text{STED}}^{\text{max}}}{I_{\text{sat}}}}}, \quad (3)$$

avec  $\lambda$  la longueur d'onde, NA l'ouverture numérique de l'objectif,  $I_{\text{sat}}$  l'intensité de saturation des fluorophores et  $I_{\text{STED}}^{\text{max}}$  l'intensité du faisceau sombre.  $I_{\text{sat}}$  dépend de l'efficacité d'excitation, du rendement quantique du fluorophore ainsi que de l'efficacité de l'émission stimulée. Pour un fluorophore typique utilisé en microscopie STED l'intensité de saturation  $I_{\text{sat}}$  est aux alentours de  $10\text{MWcm}^{-2}$ , ce qui signifie que pour obtenir une résolution supérieure à celle imposée par la limite de diffraction, il est nécessaire d'utiliser une puissance  $I_{\text{STED}}^{\text{max}}$  d'au moins  $100\text{MWcm}^{-2}$ . Avec ces  $100\text{MWcm}^{-2}$ , on a alors une résolution améliorée par un facteur 3.3.

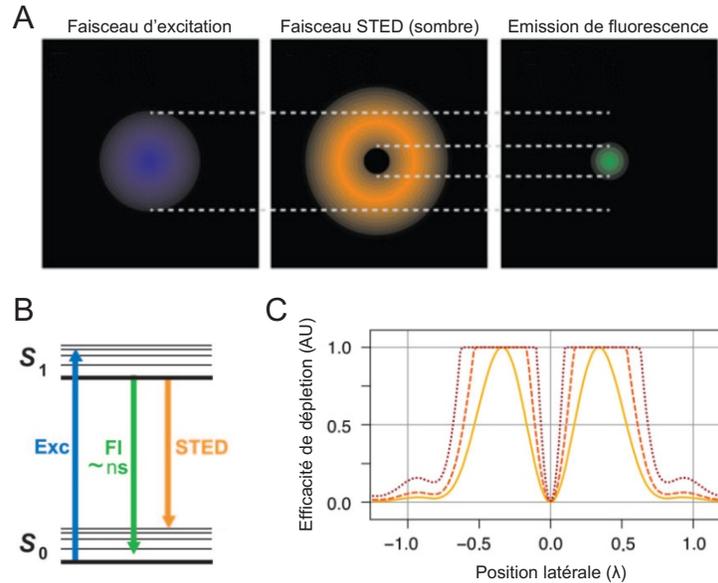


FIGURE 0.19 – *A/* Image des faisceaux laser au point focal ainsi que la distribution d'émission de fluorescence. *B/* Diagramme énergétique montrant l'effet de déplétion par émission stimulée. *C/* Profils du faisceau sombre pour différentes intensités montrant l'effet de saturation. La ligne pleine indique la puissance maximale sans saturation et les lignes pointillées sont tracées pour le double puis cinq fois cette puissance. Images adaptées de [94, 95].

Du fait du principe du STED et d'après cette équation, la microscopie STED n'a pas vraiment de limite de résolution. En effet, pour une intensité  $I_{\text{STED}}^{\text{max}}$  très élevée (supérieure à  $10\text{GW/cm}^2$ ), la distance  $d_{\text{STED}}$  serait de l'ordre de quelques nanomètres et les résolutions obtenues deviennent comparables à celles obtenues par la microscopie électronique. Cependant, une intensité très élevée deviendrait nocive dans le cas d'observation de tissus biologiques vivants et le photoblanchiment associé aux fluorophores serait également trop élevé. En restant dans des gammes d'intensité réalistes (de l'ordre de quelques centaines de  $\text{MW/cm}^2$ ), le STED

permet de descendre à des résolutions de l'ordre de 50 nm dans des tissus biologiques, ce qui est quatre fois mieux que la résolution standard d'un microscope confocal.

### 0.2.5 Microscopie par localisation de molécule unique : SMLM (PALM, STORM)

Le principe de base de ces méthodes est la localisation de molécules fluorescentes uniques avec une très grande précision : de l'ordre de quelques nanomètres. En effet, même si la résolution est limitée par la limite de diffraction, lorsqu'une molécule fluorescente unique est imagée, il devient possible de déterminer sa position avec une extrême précision, dépendant du nombre de photons collectés. La précision sur la position de la molécule fluorescente est approximativement inversement proportionnelle à la racine carrée du nombre de photons collectés dans la tache de diffraction :

$$p_{\text{fluo}} \approx \frac{d_{\text{PSF}}}{\sqrt{N}}, \quad (4)$$

avec  $d_{\text{PSF}}$  la largeur de la PSF du système et  $N$  le nombre de photons.

Le problème restant est qu'un marquage fluorescent dans un échantillon biologique contient des millions de molécules fluorescentes. Il faut donc trouver un moyen pour les observer une par une, ou du moins en petit nombre et bien séparées spatialement, pour être capable de détecter une PSF unique et séparée par molécule. La solution proposée par les méthodes PALM (PhotoActivated Localization Microscopy [96]), STORM (STochastic Optical Reconstruction Microscopy [97]) et leurs dérivés est d'utiliser les propriétés de photoactivation de certaines molécules fluorescentes. Ces molécules possèdent deux états d'émission : un état de fluorescence ou activé et un état sombre ou inactivé. On utilisera alors deux lasers différents, un pour activer les molécules fluorescentes et un laser d'excitation qui inactivera également les molécules fluorescentes. Le laser d'activation ne sera utilisé qu'à faible puissance pour ne permettre de n'activer aléatoirement qu'une faible proportion des molécules fluorescentes. Lorsque seulement une faible portion des molécules fluorescentes est activée, il devient possible de les localiser précisément et, en répétant le procédé un grand nombre de fois, il est possible d'obtenir la localisation de la quasi-totalité des molécules et ainsi de reconstruire une image de très haute résolution.

Ces techniques ont pour avantage d'être basées sur la microscopie par épifluorescence qui est très répandue et fortement utilisée dans les études biologiques. Elles permettent également de descendre à des résolutions de l'ordre de quelques nanomètres et d'obtenir ainsi des images d'une grande qualité. L'un des inconvénients majeurs de ce type de technique est l'utilisation de marqueurs fluorescents spécifiques permettant de passer d'un état activé à un état inactivé, ce qui limite encore les applications possibles (bien que de nombreux efforts soient faits dans la production de diverses molécules fluorescentes avec ces propriétés). En plus de cette contrainte, les molécules fluorescentes doivent pouvoir être très brillantes, vu que la précision

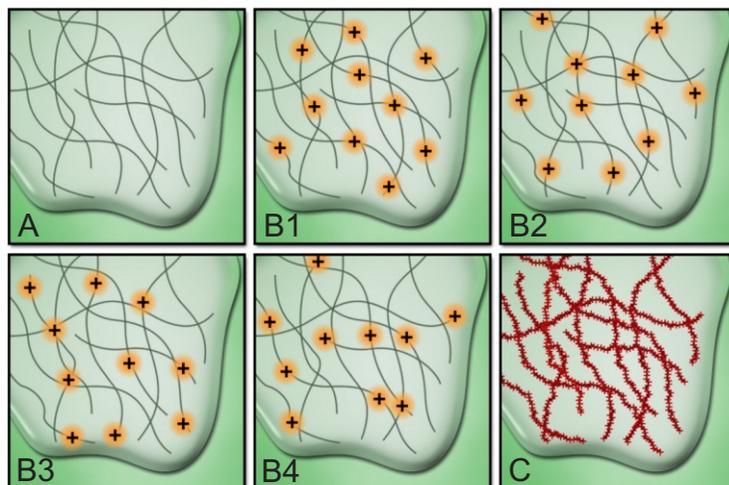


FIGURE 0.20 – *A*/ Schéma simplifié d'un échantillon biologique avec un marquage fluorescent. *B*/1-4 : Exemples d'activation et d'excitation d'une sous-population de molécules fluorescentes, les molécules doivent être bien séparées les unes des autres pour être localisées correctement. *C*/ Reconstruction après localisation des molécules fluorescentes de l'échantillon. Images adaptées [98].

de la localisation est directement liée au nombre de photons détectés, et avoir un faible taux d'activation spontanée. De plus, le traitement de l'image qui permet la localisation peut être vu comme une contrainte par certains, et le temps d'acquisition nécessaire pour obtenir la position d'une majorité des molécules fluorescentes reste un blocage à l'acquisition de procédés biologiques rapides.

### 0.2.6 Microscopie holographique : DHM

On peut remonter la découverte du concept de l'holographie aux théories développées par Gabriel Lippmann, en 1886, qui utilisa des interférences pour obtenir des images en couleurs. Après de nombreuses années de recherches sur le sujet, il reçut le prix Nobel de physique en 1908. Ses travaux servirent de base à Dennis Gabor pour ses recherches sur l'holographie.

La méthode de microscopie par holographie fut proposée pour la première fois par Dennis Gabor en 1948 [99] ; il reçut le prix Nobel de physique en 1971 pour ses travaux sur cette découverte. Il fallut ensuite attendre les développements sur les lasers et l'apparition des détecteurs numériques pour qu'en 1967 J.W. Goodman propose pour la première fois une méthode de microscopie holographique numérique [39]. Depuis, les avancées sur les lasers, la prolifération des détecteurs numériques et les développements des capacités numériques des ordinateurs ont permis à la microscopie par holographie numérique de devenir une méthode d'imagerie efficace et de plus en plus répandue.

Le principe de fonctionnement de la microscopie par holographie est d'utiliser deux faisceaux

cohérents dont l'un va illuminer l'échantillon et l'autre va être utilisé comme référence. Ces deux faisceaux sont ensuite combinés pour former une figure d'interférence qui sera enregistrée sur un hologramme physique, ou numériquement dans le cas de la microscopie DHM. Dans le cas de la microscopie holographique numérique, l'image est reconstruite par ordinateur à partir de l'hologramme enregistré. La microscopie DHM a une résolution optique (200-500 nm) dans le plan transversal et une résolution nanométrique [100] voire même inférieure [101] selon la direction axiale. Cette méthode peut donc être considérée comme une méthode de superrésolution puisque la résolution axiale est bien meilleure, de plusieurs ordres de grandeur, que celle imposée à la microscopie optique classique par la limite de diffraction.

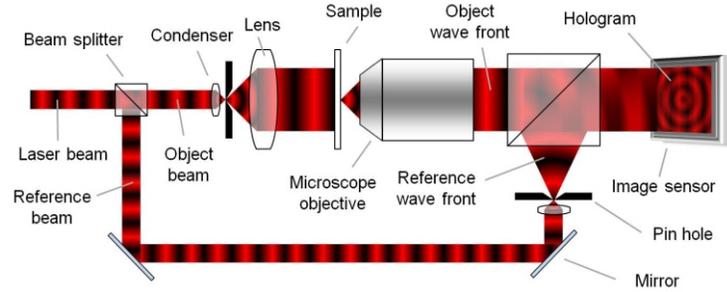


FIGURE 0.21 – Schéma simplifié d'un microscope holographique numérique. Image adaptée de [102].

La microscopie par holographie numérique permet d'imager des échantillons biologiques sans avoir à utiliser de marqueur de contraste tel que la fluorescence tout en ayant une bonne résolution transversale et une résolution surpassant les limites de résolution classique selon l'axe optique (résolution axiale). Pour plus de détails sur les méthodes de microscopie par holographie se référer à [100,103].

### 0.2.7 Microscopie par illumination structurée (SIM)

La microscopie par illumination structurée (SIM : Structured Illumination Microscopy [104]) est une technique d'augmentation de résolution basée sur la microscopie en épi-fluorescence utilisant l'effet Moiré pour obtenir de l'information supplémentaire sur l'échantillon. En épi-fluorescence classique, l'illumination de l'échantillon est uniforme et le signal de fluorescence de l'échantillon est proportionnel à l'intensité de l'illumination uniforme. Le signal de fluorescence  $S_{fluo}(r)$  émis s'exprime donc, dans le domaine de Fourier par une convolution :

$$\hat{S}_{fluo}(u) = \hat{C}_{fluo}(u) * \hat{I}_0, \quad (5)$$

avec  $*$  désignant le produit de convolution,  $C_{fluo}(r)$  la concentration de molécules fluorescentes dans l'échantillon,  $u$  la fréquence spatiale et  $I_0$  l'intensité de la lumière d'illumination uniforme.

En microscopie par illumination structurée, on remplace l'illumination uniforme  $I_0$  par une illumination sinusoïdale  $I_{sin}(r) = I_0 [1 + \cos(\mathbf{k} \cdot \mathbf{r} + \phi)]$ , ce qui permet d'obtenir une image

avec de l'information de haute résolution encodée dans des interférences de Moiré. Cette illumination sinusoïdale  $\hat{I}_{\text{sin}}$  s'exprime dans le domaine de Fourier :

$$\hat{I}_{\text{sin}}(u) = I_0 \left( 1 + \frac{1}{2} \delta_{u_0}(u) e^{j\phi} + \frac{1}{2} \delta_{-u_0}(u) e^{-j\phi} \right), \quad (6)$$

avec  $I_0$  constant,  $\delta_{u_0}(u)$  la fonction Dirac à la fréquence  $u_0$  et  $e^{j\phi}$  le facteur de phase.  $u_0$  correspond à la fréquence du sinus utilisée pour moduler l'illumination. En injectant la formule de l'illumination de l'équation (6) dans l'équation (5), on obtient l'expression, dans le domaine de Fourier, du signal de fluorescence émis suivant :

$$\hat{S}_{\text{SIM}}(u) = I_0 \left( \hat{C}_{\text{fluo}}(u) + \frac{1}{2} \hat{C}_{\text{fluo}}(u + u_0) e^{j\phi} + \frac{1}{2} \hat{C}_{\text{fluo}}(u - u_0) e^{-j\phi} \right), \quad (7)$$

$$\hat{S}_{\text{SIM}}(u) = \hat{S}_{\text{fluo}}(u) + \frac{1}{2} \hat{S}_{\text{fluo}}(u + u_0) e^{j\phi} + \frac{1}{2} \hat{S}_{\text{fluo}}(u - u_0) e^{-j\phi}, \quad (8)$$

Grâce à cette illumination sinusoïdale, le signal de fluorescence total émis contient des informations supplémentaires au signal de fluorescence de base émis  $\hat{S}_{\text{fluo}}(u)$ . Les termes  $\hat{S}_{\text{fluo}}(u \pm u_0)$  apportent de l'information provenant de régions du domaine de Fourier décalées de  $\pm u_0$ . Il reste cependant un problème. La seule mesure obtenue est la somme des trois termes et il faut donc trouver un moyen de les séparer pour en extraire l'information. Étant donné que chaque coefficient est pondéré par un facteur de phase  $e^{\pm j\phi}$ , il suffit de prendre trois images avec une illumination sinusoïdale ayant une phase différente pour obtenir un système de trois équations à trois inconnues nous permettant de séparer l'information. Nous obtenons donc un gain de résolution selon une direction et pour obtenir un gain uniforme en deux dimensions, il suffit de changer l'orientation de l'illumination sinusoïdale, ce qui permet de remplir le plan de Fourier.

La méthode la plus utilisée pour obtenir une illumination sinusoïdale est l'utilisation de réseaux de diffraction dans une monture mécanique permettant de tourner et de translater le réseau pour obtenir différentes orientations et phases. Pour la microscopie SIM la plus simple neuf acquisitions sont nécessaires, trois phases pour trois directions de l'illumination sinusoïdale, ce qui permet de remplir l'espace réciproque comme montré à la fig. 0.22-A.

## 0.2.8 Microscopie SLAM

La microscopie SLAM (Switching LAsEr Modes) est une méthode introduite dans [41, 107] (qui est aussi présentée dans [108] sous le nom de FED ou Fluorescence Emission Difference microscopy). Elle permet d'augmenter la résolution d'images de microscopie confocale par un facteur  $\approx 2$ . Cette méthode a également été utilisée en microscopie CARS [109]. Cette méthode utilise deux images prises successivement avec deux modes laser différents : l'un est un mode gaussien fondamental ( $\text{TEM}_{00}$ ) et l'autre un mode en beigne de type Laguerre-Gauss. L'étude

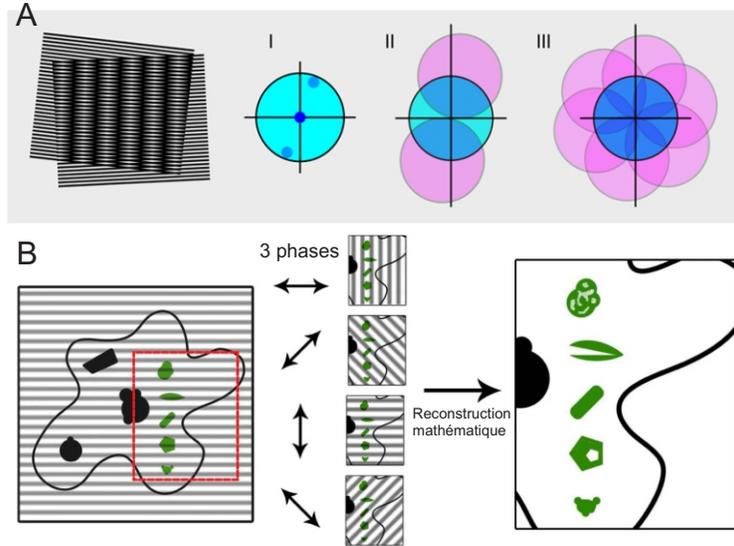


FIGURE 0.22 – *A/* Représentation de l’effet Moiré puis du remplissage du plan de Fourier avec les trois angles de l’illumination sinusoïdale. *B/* Exemple schématique de la reconstruction d’une image en microscopie par illumination structurée : l’échantillon est imagé avec au moins trois orientations et trois phases différentes. Images adaptées [105, 106].

présentée par [41] propose plusieurs méthodes pour créer un faisceau en beigne. Ici, nous n’en garderons qu’une seule : le mode  $TE_{01}$ . Un exemple de distribution d’intensité typiquement utilisée en microscopie SLAM est présenté à la fig. 0.23.

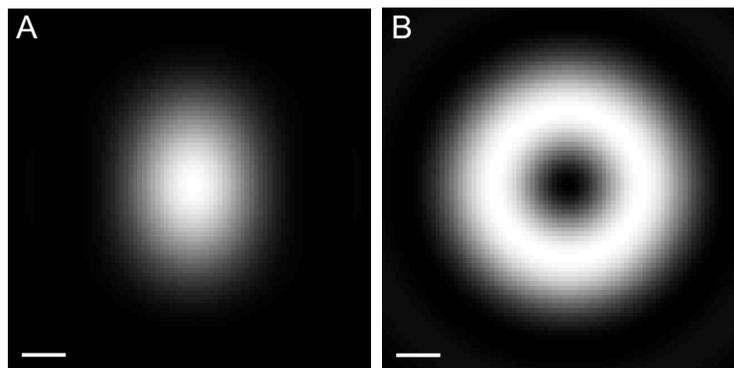


FIGURE 0.23 – Distribution d’intensité des deux modes laser. *A/* Mode  $TEM_{00}$  gaussien de polarisation verticale. *B/* Mode  $TE_{01}$  de polarisation azimuthale (mode beigne). La taille du pixel de la simulation est de 10 nm. Barre d’échelle : 100 nm.

L’image SLAM est obtenue en soustrayant l’image obtenue avec le faisceau beigne de l’image obtenue avec le faisceau plein. L’éq. (9) décrit le traitement de l’image SLAM.  $g$  est un facteur de poids qui permet d’ajuster la soustraction. Ce facteur peut prendre des valeurs allant de 0 à 1. Cependant, la plupart du temps, les valeurs de  $g$  seront plutôt entre 0.5 et 1.

$$I_{\text{SLAM}} = I_{\text{bright}} - g \times I_{\text{donut}}. \quad (9)$$

À cause du fort bruit présent dans les images de microscopie confocale, les images sont filtrées avec un filtre passe-bas gaussien (de largeur à mi-hauteur de 2 pixels) avant la soustraction de SLAM. La méthode SLAM est basée sur la technologie de balayage laser et peut donc être intégrée à un système de microscopie commercial simplement en ajoutant un module pour convertir le faisceau laser du faisceau brillant au faisceau sombre beigne et vice-versa.

### **0.2.9 Autres méthodes de superrésolution**

Il existe bien d'autres méthodes permettant d'obtenir des images ayant une résolution supérieure à celle prédite par la limite de diffraction. Ce paragraphe présente une liste de quelques exemples d'autres méthodes de superrésolution en microscopie optique.

La microscopie par balayage d'image : ISM [110,111].

La microscopie par fluctuation optique : SOFI [112].

La microscopie par localisation assistée par photoblanchiment : BaLM [113].

La microscopie par photoblanchiment avec procédé non linéaire : PiMP [114].

La microscopie à flux de photon minimal : MINFLUX [115].

## **0.3 Microscopie par déconvolution**

Il existe également une méthode mathématique permettant de corriger un signal pour le débarrasser de ses aberrations : la déconvolution. Nous la présentons séparément, car il ne s'agit pas d'une méthode de microscopie optique de superrésolution, mais d'un domaine plus général. Nous l'utiliserons cependant dans le cadre de la microscopie optique pour améliorer la résolution des images acquises.

### **0.3.1 Les bases de la déconvolution**

La déconvolution est une des approches liées au domaine du traitement du signal parmi les plus répandues. La déconvolution est utilisée dans un grand nombre de domaines allant de l'astronomie à la microscopie. Elle a pour but de corriger des signaux ou images en compensant les réponses impulsionnelles des instruments utilisés dans l'acquisition du signal. En effet, lors de l'acquisition d'un signal par un instrument, cet instrument modifie, altère le signal reçu avant de l'enregistrer. Cette distorsion est modélisée par une fonction : la réponse impulsionnelle. La réponse impulsionnelle d'un instrument de mesure (microscope, télescope, appareil photo, ...) permet de caractériser les défauts de cet instrument et est un paramètre essentiel pour la déconvolution. Cette réponse impulsionnelle est appelée PSF (Point Spread Function) dans les domaines de l'imagerie. Cette fonction caractérise les imperfections du processus d'acquisition telles que les mouvements d'un appareil photo pendant la prise de vue, ou encore les perturbations atmosphériques lors d'une prise d'image avec un télescope. Il est bon de noter

que cette réponse impulsionnelle ou PSF ne modélise pas les dégradations du signal liées à du bruit, qui par définition est un phénomène aléatoire.

En astronomie, la déconvolution est utilisée, par exemple, pour corriger les flous dans les images, notamment ceux qui sont dus à des perturbations atmosphériques [116–120]. En microscopie, la déconvolution est généralement utilisée pour obtenir un sectionnement optique dans des images 3D [121, 122] ou pour améliorer la résolution en corrigeant le flou apporté par la limite de diffraction de la lumière [120, 123].

Le but premier de la déconvolution est de corriger les aberrations modélisées dans cette PSF et de retrouver l'image (ou le signal) originale.

### 0.3.2 La déconvolution en microscopie optique

La déconvolution est une méthode dérivée de la théorie des problèmes inverses [124]. Avant de parler de problèmes inverses, il est bon de définir le problème direct. Le problème direct consiste à modéliser un système (microscope) pour mettre en lien les données observées avec les paramètres du système et ainsi produire un modèle mathématique de prédiction. En microscopie optique, on modélise la formation d'une image comme étant le produit de convolution entre l'objet observé et la PSF de l'instrument. Ce produit de convolution s'exprime comme suit :

$$y(k) = h(k) * x(k) + n(k), \quad (10)$$

où  $x$  est la distribution d'intensité de l'objet,  $y$  est l'observation de cet objet (image acquise par notre instrument de mesure),  $h$  est la PSF de notre instrument de mesure,  $n$  représente le bruit,  $k$  représente la position du pixel et  $*$  est le produit de convolution. Cette équation décrit le procédé de formation d'image comme étant le produit de convolution entre l'image parfaite de l'objet et la PSF de l'instrument, auquel s'ajoutent divers bruits de mesure ; elle représente le modèle direct lié à l'acquisition d'images par un microscope.

Le problème inverse associé à ce modèle a donc pour but d'inverser correctement ce produit de convolution pour obtenir l'image parfaite et annuler ainsi l'effet de la PSF, en faisant attention à prendre en compte correctement du bruit. Ce problème inverse est appelé déconvolution. En microscopie optique, la déconvolution fut introduite pour la première fois, en 1984, par D.A. Agard [125] pour récupérer un sectionnement optique sur un microscope en épi-fluorescence et elle s'est répandue depuis à tout type de microscopie optique. De la microscopie confocale [126, 127] à la microscopie STED [128], la déconvolution est maintenant présente dans un grand nombre de logiciels de microscopie ; plusieurs logiciels de déconvolution appliqués à la microscopie sont maintenant disponibles sur le marché [129, 130].

## 0.4 Quelle définition pour la superrésolution ?

Nous avons déjà bien défini le terme de *résolution* en microscopie optique, il reste maintenant à analyser et à résumer les différentes définitions qui ont été données au terme *superrésolution*. Ce terme est, en effet, employé dans un grand nombre de publications et toutes les méthodes présentées précédemment (en section 0.2) ne sont pas toujours incluses dans le spectre des méthodes de superrésolution. C'est pour cela que nous avons regroupé dans cette section les différentes définitions utilisées pour la superresolution pour enfin donner notre avis de ce qui peut être considéré comme méthode de superrésolution.

La superrésolution réfère souvent aux méthodes capables de franchir la limite de diffraction imposée à la microscopie optique, limite de résolution décrite amplement par Ernst Karl Abbe ou John William Strutt, 3rd Baron Rayleigh (voir paragraphe 0.1.5 sur les limites de résolution). L'un des premiers à proposer l'existence de méthodes de superrésolution pouvant surpasser les limites imposées par la diffraction fut Giuliano Toraldo di Francia : « This means that at present there is only a practical limit (if any) and not a theoretical limit for two-point resolving power » [131].

En 1967, Charles W. McCutchen propose comme définition de la superrésolution toute méthode permettant d'obtenir des détails plus fins que ceux décrits par la limite de résolution de Abbe « superresolution, that is, resolution of detail finer than the Abbe resolution limit », mais exclut toute méthode proposant une amélioration limitée de par son principe : « We might not call this effect superresolution, because the improvement is, even in principle, limited ; nevertheless a gain of resolution of more than a factor of 2 is not negligible » [132].

En 1986, Ingemar J. Cox et Colin J.R. Sheppard proposèrent deux définitions différentes permettant de séparer les méthodes de superrésolution dans deux catégories différentes. La première, nommée ultrarésolution, est définie comme permettant de surpasser le critère de Rayleigh généralisé, mais ne permet pas d'étendre la couverture spectrale au-delà de la fréquence de coupure (fréquence maximale transmise correctement par le système) : « The first, which increases the generalized Rayleigh resolution but does not extend the spatial cutoff frequency, shall be termed ultrasresolution » [133]. La seconde, nommée elle superrésolution, inclut les méthodes permettant d'augmenter la fréquence de coupure : « The second category of superresolution techniques increases the spatial frequency cutoff of an optical system » [133]. Dans leur publication de 2009, B. Huang et M. Bates font la distinction entre méthodes d'augmentation de résolution et méthodes de superrésolution [68]. Les premières, permettent d'augmenter la résolution en étendant la limite de résolution vers des valeurs plus petites. Ces méthodes d'augmentation de résolution ne sont pas considérées comme superrésolution puisque la diffraction de la lumière est toujours un facteur limitant : « Albeit a significant improvement, this resolution is still fundamentally limited by the diffraction of light ». Dans ces méthodes, on retrouve la microscopie confocale, 4Pi et SIM. La microscopie SLAM entrerait

dans cette catégorie. La superrésolution, quant à elle, ne décrit que les méthodes capables de casser complètement la limite de diffraction : « One approach to attain a resolution far beyond the limit of diffraction, i.e., to realize superresolution microscopy,... ». Parmi ces méthodes, on retrouve celles qui sont basées sur le contrôle de l'illumination : STED, Resolft, SSIM et celles qui sont basées sur la localisation de molécules fluorescentes : STORM, PALM, FPALM. La déconvolution entrerait dans la seconde catégorie, la résolution ne dépend pas de la diffraction de la lumière, mais du rapport signal à bruit et de la précision de la mesure de la PSF (qui dépend essentiellement du bruit).

En 2011, C.G. Galbraith et J.A. Galbraith définissent la superrésolution comme la capacité d'un microscope à améliorer la résolution d'un facteur d'au moins deux par rapport à la limite de résolution conventionnelle : « Any microscopy technique that overcomes the resolution limit of conventional light microscopy by at least a factor of two is considered to be a superresolution technique » [62].

Dans leur publication de 2016, K. Nienhaus et G.U. Nienhaus définissent les méthodes de superrésolution comme ayant en principe une résolution illimitée : « Only “true” superresolution techniques, however, ..., offer in principle unlimited resolution » [72]. D'après cette définition seules les méthodes telles que STED, PALM, STORM, et leurs dérivés, entrent dans la classe des méthodes de superrésolution. Si l'on suit cette définition, les méthodes de déconvolution entrent dans cette catégorie de superrésolution puisque, en principe, la déconvolution n'a pas vraiment de limite de résolution.

La majorité des définitions proposées fait la différence entre les méthodes proposant une amélioration de résolution fixe ou limitée, et les méthodes proposant une amélioration en théorie illimitée. Cependant, il faudrait remarquer que, selon la précision des hypothèses de départ, toutes les méthodes de superrésolution sont limitées. Avec cette définition, les méthodes du type SMLM proposent une résolution illimitée seulement lorsque le bruit est ignoré et que les molécules sont considérées infiniment brillantes. Les microscopies du type STED proposent une résolution illimitée seulement dans le cas où les molécules fluorescentes seraient infiniment stables ou possèdent une intensité de saturation infiniment petite. Si l'on change cette fois-ci les hypothèses pour en obtenir des plus réalistes, comme des molécules qui ne sont pas infiniment brillantes ou infiniment stables, les résolutions de ces méthodes en deviennent limitées, non pas par la diffraction de la lumière, mais par d'autres phénomènes physiques.

Cette définition de la superrésolution, comme ne regroupant que les méthodes ayant une résolution infinie de par leur principe, serait donc biaisée par les hypothèses de départ utilisées pour comparer les méthodes. De plus, si l'on considère un monde de microscopie optique sans bruit et avec des molécules infiniment brillantes, la déconvolution proposerait également une résolution infinie, puisque sans bruit, la déconvolution n'est qu'une simple division par la MTF. Avec des molécules infiniment brillantes, il devient possible de mesurer la PSF, et donc

la MTF, avec une précision infinie. Cela rendrait toute méthode de superrésolution inutile.

Plutôt que de considérer ce type de définition qui exclut certaines méthodes qui ont simplement des postulats différents, la première partie de la définition proposée par McCutchen « superresolution, that is, resolution of detail finer than the Abbe resolution limit » paraît plus réaliste et permet de mieux englober le spectre des méthodes proposant une résolution améliorée en microscopie optique.

Cette dernière définition est également plus proche du terme superrésolution au sens étymologique du terme. Le préfixe *super* vient du latin *super* qui signifiait au-dessus. La microscopie à superrésolution pourrait se dire également microscopie avec une résolution au-dessus de la normale, ce qui n'imposerait rien d'autre que de dépasser la limite de résolution de la microscopie classique définie par Abbe.

## 0.5 Comparatif des méthodes de microscopie optique

Dans cette section, nous allons comparer brièvement les différentes méthodes de microscopie optique et microscopie de superrésolution pour tenter d'établir un guide permettant à des utilisateurs novices ou peu expérimentés de choisir la ou les bonnes méthodes pour un problème donné. La plupart des applications analysées seront dans le domaine des neurosciences, mais les conclusions peuvent être généralisées aux domaines du biomédical plus globalement. Étant donné le domaine d'étude choisi, les longueurs d'onde utilisées en microscopie optique sont restreintes au domaine du visible et proche infrarouge.

### 0.5.1 Comparaison des méthodes

Les microscopies par épi-fluorescence, confocale et deux photons sont les trois principales modalités de microscopie optique utilisées. Elles sont toutes les trois relativement simples à utiliser, mais leur résolution est limitée par la diffraction de la lumière. Les microscopies confocales et deux photons parviennent à passer outre cette limite de diffraction pour la résolution axiale en proposant un sectionnement optique de l'ordre du micromètre.

Malgré les limitations en résolution qui restreignent les champs d'applications à l'observation de cellules entières ou de sous-compartiments cellulaires de grande taille (plusieurs centaines de nanomètres), ces techniques ont l'avantage d'être relativement simples à utiliser et peu coûteuses, exception faite des lasers pulsés pour la microscopie deux photons. La microscopie deux photons garde un avantage significatif par rapport aux microscopies par épi-fluorescence et confocale : la distance de travail supplémentaire donnée par l'utilisation de laser infrarouge nécessaire à l'effet deux photons [134]. La microscopie deux photons est souvent utilisée pour observer en profondeur dans les tissus biologiques.

Les microscopies du type 4Pi et I5M ont l'avantage de permettre un sectionnement optique plus

fin, permettant une résolution axiale de l'ordre de 70-120 nm [83,135] au prix d'une complexité fortement augmentée par rapport à la microscopie confocale ou deux photons. De plus, ce type de microscopie ne permet pas d'effectuer d'observation sur des échantillons épais, tel que des échantillons de cerveaux de mammifères, étant donné la nécessité d'avoir deux objectifs en opposition de part et d'autre de l'échantillon. La distance de travail maximale possible est de l'ordre de 50  $\mu\text{m}$  [135]. Ces méthodes sont donc restreintes à l'observation d'échantillons fins ( $< 50 \mu\text{m}$ ) mais permettent cependant une résolution supérieure à la microscopie optique classique.

La microscopie TIRF est un autre type de microscopie proposant une augmentation de la résolution axiale jusqu'à une centaine de nanomètres [136]. Étant donné la méthode utilisée pour obtenir un tel gain, ce type de microscopie est incompatible avec l'observation d'échantillon volumétrique. Seule la partie de l'échantillon proche de la lamelle du microscope peut être imagée ( $\approx 200 \text{ nm}$ ) ce qui permet de fortement augmenter le rapport signal à bruit par rapport à la microscopie optique classique [78]. Ce type de microscopie reste suffisamment simple pour que dans le cas d'observation d'échantillon plat et peu épais (quelques centaines de nanomètres à quelques micromètres) la méthode devient très intéressante. Bien que l'imagerie TIRF multicolore soit possible et ait permis d'étudier des mécanismes d'exocytose et d'endocytose [137], elle reste complexe à mettre en œuvre étant donné que l'ajustement de l'angle d'illumination doit être fait sur plusieurs lasers.

Concernant la microscopie NSOM, il s'agit d'une méthode extrêmement complexe puisqu'il est nécessaire d'approcher une fibre optique extrêmement fine à quelques dizaines de nanomètres de l'échantillon pour bénéficier d'une résolution optimale. Pour pouvoir balayer la fibre optique à quelques nanomètres de l'échantillon la microscopie NSOM est souvent ajoutée à un AFM (Atomic force microscope). La résolution dépend de la largeur de la fibre optique utilisée et peut descendre jusqu'à la dizaine de nanomètres [89–92]. Étant donné la méthode d'observation utilisée en microscopie NSOM, il est impossible d'obtenir de l'information en profondeur sur un échantillon. La microscopie NSOM reste limitée à l'observation de surfaces (sur une épaisseur d'une dizaine de nanomètres). Cependant, il est possible d'effectuer des mesures de surfaces très précises à condition que l'échantillon ne soit pas trop volumineux.

La vitesse d'acquisition reste également un problème majeur puisqu'il faut scanner physiquement la fibre au-dessus de l'échantillon. Il est tout de même possible d'obtenir des vitesses d'acquisition descendant à 0.5 s en utilisant des oscillateurs à quartz [138]. De plus, étant donné que la microscopie NSOM balaye une ouverture extrêmement proche de l'échantillon, les risques d'altérer l'échantillon avec la sonde sont importants [139].

La microscopie STED utilise l'émission stimulée de molécules fluorescentes pour améliorer grandement la résolution transversale d'un microscope optique à balayage laser, jusqu'à 20-30 nm dans des échantillons biologiques [95]. Cette amélioration vient au prix de lasers pulsés

coûteux et d'une complexité de montage et d'utilisation fortement augmentée par rapport à un microscope optique classique (confocal par exemple). La résolution axiale peut également être améliorée par la microscopie STED, mais le coût et la complexité augmentent d'autant plus puisque cette amélioration est obtenue en combinant microscopie STED et 4Pi [140,141].

Les puissances utilisées pour le faisceau de déplétion en microscopie STED sont telles que le photoblanchiment des fluorophores ainsi que la phototoxicité induite sur les échantillons sont importants et visibles même lors d'illuminations courtes [142].

De plus, ce type de microscopie nécessite des molécules fluorescentes extrêmement stables pour bénéficier de la résolution idéale. Certaines variantes du STED proposent de diminuer les contraintes, mais le gain en résolution en est fortement diminué et les résolutions obtenues sont autour de 60-100 nm [143,144].

La microscopie STED reste particulièrement utile lors de l'observation de sous-compartiments cellulaires de taille bien inférieure à la limite de résolution des microscopes optiques classiques ( $<100$  nm). Bien qu'il soit effectivement possible d'obtenir des images multicolores en microscopie STED, et ce, jusqu'à 3 canaux, le chevauchement entre les spectres d'absorption et de déplétion des fluorophores utilisés augmente fortement le photoblanchiment et la phototoxicité de la méthode, imposant une réduction du temps d'exposition, réduisant ainsi fortement les résolutions obtenues ( $\approx 100$  nm) [145].

La microscopie STED a par exemple été utilisée pour étudier des groupements de protéines membranaires [146,147]. Cependant, dans le cas de telles études, le champ de vue est souvent restreint à des dimensions de l'ordre de quelques dizaines de micromètres de diamètre. Bien qu'il soit possible d'effectuer des mesures en temps réel sur des échantillons biologiques vivants en microscopie STED ( $\approx 30$  images par seconde) le champ de vue devient encore plus limité (quelques micromètres) et la résolution obtenue n'est pas optimale ( $\approx 60$  nm) [148]. Le champ de vue est d'autant plus réduit que l'amélioration en résolution spatiale et temporelle est importante [76].

De plus, la densité du marquage fluorescent, i.e. la proportion de molécules marquées par des fluorophores, a un fort impact sur la qualité de l'image STED obtenue [149]. Avec une densité de marquage non optimale, la résolution peut être fortement dégradée.

Dans le cas d'observation de tissus, où la dispersion est problématique, l'effet 2-photons peut être utilisé pour le faisceau d'excitation [150] et des systèmes d'optique adaptative peuvent être nécessaire pour minimiser les aberrations et ainsi obtenir un faisceau de déplétion de qualité [151].

Les microscopies SMLM proposent des résolutions transversales impressionnantes, descendant jusqu'à la dizaine de nanomètres [152], au prix d'un temps d'acquisition augmenté d'une faible distance de travail. Cette distance de travail est souvent inférieure au micromètre puisque les

méthodes de SMLM sont souvent combinées avec une illumination TIRF [51]. Ces méthodes requièrent également l'utilisation de molécules fluorescentes très spécifiques. Il est également possible d'augmenter la résolution axiale, jusqu'à environ 30 nm [153]. Les méthodes de microscopie SMLM restent très intéressantes lors de l'observation de phénomènes dont les dimensions descendent en dessous des 50 nm ; cependant la difficulté est grandement augmentée dans le cas de phénomènes dynamiques.

En microscopie SMLM, l'acquisition d'images multicolores, avec plusieurs canaux de fluorescence, reste cependant complexe à mettre en œuvre notamment en microscopie STORM à cause des limitations imposées par les solutions tampon utilisées [154]. Ces solutions tampon présentent un gros problème de toxicité dans le cas d'imagerie sur des échantillons vivants [76]. L'imagerie « in vivo » reste cependant possible malgré les complications, mais la fréquence d'acquisition reste limitée à l'ordre du Hertz [155].

Dans le cas de la microscopie STORM, la cinétique des molécules fluorescentes a un fort impact sur la qualité de l'image obtenue et la résolution peut en être fortement affectée [156].

La microscopie DHM ne requiert pas l'utilisation de molécules fluorescentes et permet d'obtenir une résolution axiale nanométrique. L'inconvénient principal de cette méthode est que l'illumination doit traverser l'échantillon, ce qui ajoute à la complexité du microscope et qui empêche l'observation « in vivo » sur des échantillons épais (quelques centaines de micromètres) et peu transparents [157]. La microscopie DHM est considérée comme peu invasive et permet d'observer des processus dynamiques dans un environnement sans marquage [158]. Il est également possible d'obtenir une reconstruction 3D à condition de pouvoir faire tourner l'échantillon [159].

La microscopie SIM propose un compromis entre gain en résolution plus modeste, permettant des résolutions transversales de l'ordre de la centaine de nanomètres et axiale de quelques centaines de nanomètres [160], et une simplicité relative d'utilisation. Étant donné que la microscopie SIM est basée sur un microscope par épi-fluorescence, la distance de travail reste faible et il est difficile d'observer des échantillons épais en profondeur. Pour pouvoir imager des échantillons épais (quelques dizaines de micromètres), il est nécessaire d'augmenter le nombre d'illuminations pour compenser la perte de contraste liée à la diffusion dans les tissus épais [161].

Les versions de la microscopie SIM utilisant la saturation des molécules fluorescentes permettent d'obtenir des résolutions descendant aux alentours des 50 nm en augmentant le nombre d'acquisitions nécessaires (jusqu'à 64) [162]. Cependant, dans un tel cas, les contraintes imposées aux molécules fluorescentes utilisées rejoignent partiellement celles qui sont imposées par la méthode STED.

Concernant les vitesses d'acquisition, la microscopie SIM peut atteindre des taux d'acqui-

tion supérieurs à 60 images par seconde [163] sur un champ de vue de quelques dizaines de micromètres, au prix d’une augmentation de la complexité du microscope.

Enfin, la microscopie SLAM propose un compromis entre augmentation de résolution et complexité. Elle permet une augmentation de résolution d’environ un facteur 2 sans changer significativement les modalités de la microscopie à balayage laser, qu’elle soit confocale ou deux photons [107, 164]. Ce type de microscopie est parfait pour observer des structures cellulaires dont les tailles se situent autour de la centaine de nanomètres, ce qui permet d’avoir une augmentation de résolution sans avoir recours aux autres méthodes de superrésolution qui pourraient être « overkill ».

### 0.5.2 Tableaux récapitulatifs

<b>Microscopie</b>	<b>Épi-fluorescence</b>	<b>Confocale</b>	<b>Deux photons</b>
Résolution transversale	200-300 nm	200-300 nm [78]	200-300 nm
Résolution axiale	5-10 $\mu\text{m}$	$\approx$ 0.6-1 $\mu\text{m}$ [73, 78]	0.6-1 $\mu\text{m}$
Résolution temporelle	1-10 ms	100 ms	100 ms
Photoblanchiment	Faible	Faible [78]	Faible
Distance de travail	< 100 $\mu\text{m}$ [73]	200 $\mu\text{m}$	800 $\mu\text{m}$
Simplicité	Très simple	Simple	Complexe

TABLE 0.7 – Comparaison entre les microscopies épi-fluorescence, confocale et deux photons.

<b>Microscopie</b>	<b>4Pi / I5M</b>	<b>TIRF</b>	<b>NSOM</b>
Résolution transversale	200-300 nm	200-300 nm	10-20 nm [89]
Résolution axiale	100-200 nm [82]	100 nm [73]	10 nm [89]
Résolution temporelle	100 ms	1-10 ms	1-10 min
Photoblanchiment	Faible	Faible [78]	Faible
Distance de travail	50 $\mu\text{m}$ [135]	<5 $\mu\text{m}$ [73]	<100 nm
Simplicité	Complexe	Moyenne	Très complexe

TABLE 0.8 – Comparaison entre les microscopies 4Pi / I5M, TIRF et NSOM.

<b>Méthode</b>	<b>STED</b>	<b>SMLM</b>	<b>DHM</b>
Résolution transversale	20 nm [78, 95]	10 nm [75, 78]	200-300 nm
Résolution axiale	Jusqu’à 100 nm [78, 140]	Jusqu’à 50 nm [75, 78]	1-10 nm [100]
Résolution temporelle	100 ms [73]	1 min et plus [73]	100 ms
Photoblanchiment	Élevé [78]	Faible à élevé [78]	Faible
Distance de travail	200 - 800 $\mu\text{m}$ [150]	<5 $\mu\text{m}$ [73]	100 $\mu\text{m}$ - 10 mm
Simplicité	Très complexe [75]	Complexe [75]	Complexe

TABLE 0.9 – Comparaison entre les microscopies STED, SMLM et DHM.

Les tables 0.7, 0.8, 0.9, 0.10 présentent un récapitulatif de la comparaison des diverses méthodes de superrésolution.

Méthode	SIM	SLAM
Résolution transversale	100 nm (<50 en SSIM) [78]	120 nm [107]
Résolution axiale	100-200 nm	quelques $\mu\text{m}$
Résolution temporelle	10-30 ms [73]	100 ms
Photoblanchiment	Faible [78]	Faible
Distance de travail	Faible (20 $\mu\text{m}$ ) [73]	Faible/Moyenne
Simplicité	Moyenne [75]	Simple

TABLE 0.10 – Comparaison entre les microscopies SIM et SLAM.

### 0.5.3 Exemples d’application

Un grand nombre de revues scientifiques publiées traitent des applications spécifiques des méthodes de superrésolution dans les domaines de la biologie et du biomédical. Cette section propose un aperçu de ces applications, présenté sur la base de ces revues scientifiques.

La figure 0.24 propose une vue schématique de certaines sous-structures cellulaires imagées à l’aide de méthodes de superrésolution. Bien que la totalité des méthodes de superrésolution ne soient pas représentées, cette figure résume en partie l’impact des méthodes de superrésolution en recherche en biologie cellulaire.

Dans le domaine de l’analyse de cellules végétales, la microscopie SIM semble être l’une des plus utilisées [52]. Les puissances laser utilisées par la microscopie STED et ses dérivées restent un problème majeur pour son application dans ce domaine. De plus, le nombre de marqueurs fluorescents disponibles pour ces applications est limité, et l’autofluorescence de certains tissus végétaux et pigments (e.g. chlorophylle) rendent l’imagerie STED encore plus difficile lors de l’observation de tissus végétaux. La versatilité de la microscopie SIM en a fait un outil de choix dans le domaine de la biologie végétale. Les restrictions imposées par les préparations d’échantillons ainsi que les temps d’acquisition et de traitement ont fait que, malgré les résolutions supérieures, les méthodes de microscopie SMLM sont beaucoup moins utilisées que la microscopie SIM pour l’étude de cellules végétales. Dans le cas d’études sur des tissus végétaux vivants les méthodes SIM et SMLM ont toutes deux été utilisées. Étant donné les résolutions proposées par la microscopie SIM, ainsi que les contraintes données en biologie végétale, on pourrait proposer l’utilisation des microscopies TIRF, 4Pi / I5M ou SLAM pour ces applications puisqu’elles proposent des améliorations et compromis similaires.

Dans le cas de l’étude de la zone synaptique active, les méthodes de type STED et SMLM semblent être plus répandues [77]. C’est lorsqu’il s’agit de quantifier les protéines endogènes que les microscopies SMLM se démarquent de la microscopie STED, qui nécessite d’être combinée à de la microscopie électronique [165]. C’est sur ce dernier aspect que les microscopies SMLM peuvent combiner information quantitative et fonctionnelle, ce qui leur donne un avantage. Cependant, les compromis nécessaires entre champ de vue, résolution spatiale et résolution temporelle font que l’étude de la zone synaptique active sur des échantillons biologiques vivants

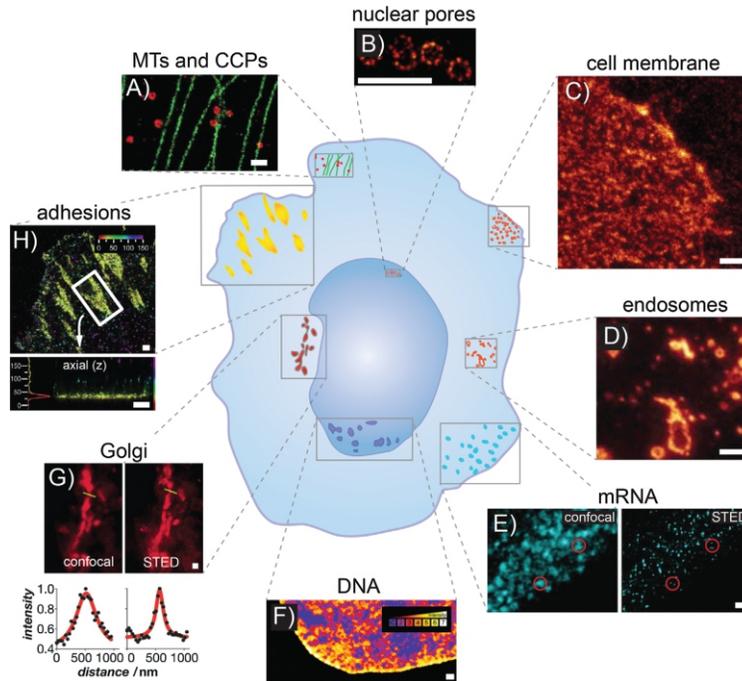


FIGURE 0.24 – Exemples d’applications des méthodes de superrésolution optique sur les sous-structures cellulaires. *A/* Image STORM de microtubules. *B/* Image dSTORM de ports nucléaires. *C/* Image STED d’assemblage de protéines à la membrane cellulaire. *D/* Images STED de récepteurs à la transferrine. *E/* Image STED de micro ARN. *F/* Images 3D-SIM de l’ADN nucléaire. *G/* Images STED de l’appareil de Golgi. *H/* Image iPALM de protéines d’attachement extracellulaire. Barres d’échelle : 500 nm. Image de [73].

reste limitée, notamment avec les méthodes STED et SMLM.

Lorsqu’il s’agit d’étudier des cellules biologiques vivantes [56, 70] les processus dynamiques nécessitent des observations sur de grands champs de vue à des vitesses d’acquisitions très rapides ( $> 30$  images par seconde). Dans le cas de microscopie du type STED/RESOLFT, un compromis doit être fait entre les dimensions du champ de vue et la vitesse d’acquisition. Ces méthodes permettent généralement d’imager des processus dynamiques lents (de l’ordre de quelques secondes) ; l’observation de processus plus rapides se fait en réduisant fortement le champ de vue. Pour ce qui est de la microscopie SIM, les vitesses d’acquisition sont en général plus rapides et le champ de vue plus grand ; cependant le moindre mouvement de l’échantillon pendant l’acquisition peut générer des artefacts lors de la reconstruction. Pour les méthodes de type SMLM, il est fait mention de deux types d’échelle de temps. La première, celle de l’acquisition d’une image, définit la vitesse limite pour le suivi de molécule unique (de l’ordre de la milliseconde). La seconde est le temps nécessaire à l’acquisition d’un grand nombre d’images pour la reconstruction de l’image de superrésolution ; dans ce cas, un compromis entre résolution spatiale et résolution temporelle est nécessaire. De plus, la phototoxicité induite par le photoblanchiment des molécules fluorescentes peut fortement endommager la cellule

et compromettre le résultat de l'étude en cours [65]. Pour l'imagerie d'échantillons vivants dynamiques, rien ne bat aujourd'hui l'imagerie en épi-fluorescence et ses dérivées (TIRF) qui peut être très facilement combinée à des algorithmes de déconvolution pour obtenir des images de haute qualité [129,130]. Les microscopies basées sur le balayage laser de l'échantillon peuvent être avantageuses dans le cas où un système de balayage rapide est disponible [166]. Les microscopies du type confocal, deux photons et SLAM deviennent donc intéressantes malgré les restrictions en résolution.

Pour l'étude des systèmes microbiens et bactériens [69], les méthodes de superrésolution sont idéales puisque, du fait de la petite taille des cellules bactériennes observées, les limitations liées à la taille du champ de vue sont presque sans impact. Notamment, bien que la microscopie SIM soit souvent plus rapide que les microscopies du type STED, la petite taille des cellules bactériennes fait que la microscopie STED rivalise, pour cette application, avec la vitesse d'acquisition de la microscopie SIM. De plus, le photoblanchiment des molécules fluorescentes et les effets phototoxiques sont particulièrement problématiques pour les cellules bactériennes de par le relativement faible nombre de molécules et de protéines qu'elles contiennent. Le manque de diversité dans les marqueurs fluorescents disponibles pour l'étude des systèmes microbiens et bactériens rend difficile l'utilisation des méthodes de microscopie SMLM. Étant donné que les échantillons observés dans les systèmes microbiens et bactériens sont de petite taille les méthodes du type DHM seraient également des méthodes intéressantes pour les étudier. Puisque les échantillons sont petits, la microscopie DHM serait capable d'imager de tels échantillons rapidement et de manière peu invasive.

Pour étudier les structures et le comportement dynamique des membranes cellulaires [139], les méthodes des types STED et SMLM sont parmi les plus couramment utilisées. Les restrictions de ces méthodes, quant aux processus dynamiques, restent cependant similaires à ce qui a été dit précédemment. Notons que la microscopie NSOM est particulièrement propice pour étudier les structures de membranes cellulaires et a même pu être appliquée sur des procédés dynamiques.

Les méthodes de superrésolution ont permis de grandes avancées dans le domaine des neurosciences [75]. Un des exemples les plus frappants est la visualisation des structures d'actine et de spectrine dans les axones par la méthode STORM (SMLM) [167]. La microscopie STED a été appliquée dans l'étude de phénomènes d'exocytose et d'endocytose dans la région synaptique ou encore pour observer les changements morphologiques de boutons synaptiques sur des rongeurs vivants. Il est également fait mention que pour obtenir une image optimale avec un microscope à superrésolution, il est souvent nécessaire d'avoir des protocoles de fixation et de préservation des tissus efficaces, ce qui ne peut pas être le cas lors de l'imagerie d'échantillons vivants. Ce problème est particulièrement présent lors d'imageries avec les méthodes du type SMLM. Dans le cas des neurosciences, les méthodes de superrésolution ne sont pas encore totalement à la hauteur des attentes. En effet, les neurones, cellules centrales de la majorité

des études en neurosciences, sont des cellules qui peuvent s'étendre sur des dizaines de centimètres dans le système nerveux central. Les limitations quant au champ de vue des méthodes de superrésolution sont donc un frein majeur pour le domaine des neurosciences. Encore une fois, les hautes puissances laser de la microscopie STED peuvent endommager les échantillons et un compromis doit être fait entre résolution et phototoxicité [78]. Les méthodes du type SIM seraient plus adaptées à l'imagerie en temps réel d'échantillons vivants et permettent d'imager des champs de vue plus larges, mais un compromis est fait sur la résolution. Quant aux méthodes de SMLM, les méthodes de marquage fluorescent limitées restent un problème.

Dans la totalité des domaines d'études en biologie où les méthodes de superrésolution sont utilisées la même conclusion est toujours présentée : quelle que soit la méthode de superrésolution utilisée, il y a toujours actuellement un compromis à faire entre résolution spatiale, résolution temporelle, taille du champ de vue et phototoxicité. Ce compromis est bien plus sévère pour les méthodes de superrésolution que pour les méthodes de microscopie optique classique. Il est donc important de connaître les limites de chaque méthode pour être capable d'effectuer un choix éclairé quant à la méthode de microscopie à utiliser pour une étude en particulier. Il est donc important aujourd'hui d'apporter de nouvelles méthodes pour compléter le spectre des méthodes de superrésolution et proposer des alternatives avec des compromis différents.

## 0.6 Objectifs de cette thèse

Après avoir comparé et analysé les différentes méthodes de superrésolution, nous avons remarqué qu'il reste un vide à combler lorsqu'il s'agit d'augmenter la résolution en microscopie optique sans ajouter de contraintes limitant fortement le champ d'application. Beaucoup de méthodes de superrésolution nécessitent des modifications complexes et coûteuses des microscopes optiques classiques, certaines sont très dépendantes des molécules fluorescentes disponibles, et un grand nombre d'entre elles restreignent fortement le type et la taille des échantillons biologiques observables.

L'objectif principal de cette thèse est de développer des méthodes d'augmentation de résolution alternatives aux méthodes de microscopie optique de superrésolution classiques. Notre travail se restreint aux méthodes de microscopie optique pour garder la possibilité d'imager des structures biologiques vivantes, ce qui n'est pas possible en microscopie électronique. La plupart des méthodes de superrésolution existantes cherchent à obtenir la meilleure résolution possible quel que soit le prix ; de ce fait, ces méthodes restreignent leur champ d'application par rapport à la microscopie optique classique. C'est ce manque que nous tenterons de combler ici, en proposant des méthodes d'augmentation de résolution qui sont compatibles avec la microscopie optique classique, dans notre cas, la microscopie confocale, et avec l'observation d'échantillons biologiques. La méthode SLAM précédemment publiée nous servira de base pour une partie de notre étude.

La première approche proposée permettant d’offrir une méthode de superrésolution alternative est l’utilisation d’un autre type de faisceau laser pour le balayage en microscopie confocale. Ce changement de faisceau laser permet une augmentation de résolution sans changement sur le principe de fonctionnement d’un microscope confocal ; seule la source laser est modifiée. De plus, les faisceaux laser proposés sont compatibles avec la méthode SLAM (cf section 0.2.8), ce qui permet de proposer une amélioration de cette dernière sans ajouter de contrainte d’application sur microscope utilisé. Contrairement à la plupart des méthodes de superrésolution qui nécessitent des modifications importantes sur le microscope ajoutant aux contraintes d’utilisation et d’applications, l’approche proposée reste une approche de microscopie confocale avec tous les avantages qui y sont liés.

Dans un second temps, nous proposons une méthode alternative à la méthode SLAM en remplaçant le post-traitement de cette dernière par une méthode de déconvolution. Cette amélioration de la méthode SLAM ne requiert aucune modification supplémentaire sur le microscope que celle nécessaire pour la méthode SLAM et conserve donc tous les avantages de la microscopie confocale, à savoir notamment sa simplicité, ses capacités d’observation d’échantillon vivant et en plusieurs couleurs.

Dans un troisième chapitre, nous étudions une autre approche de microscopie optique pour améliorer un autre aspect des microscopes optiques, à savoir les dimensions du champ de vue. Nous étudions de manière théorique une méthode de microscopie permettant d’imager un grand volume avec un minimum de compromis sur la résolution et la vitesse d’acquisition. Pour cela, nous utilisons une autre propriété des faisceaux laser présentés dans les chapitres 1 et 2 et nous utiliserons un algorithme de tomographie pour reconstruire les images en trois dimensions.

# Chapitre 1

## Les faisceaux Bessel-Gauss en microscopie confocale

L'objectif de ce projet est d'utiliser les faisceaux Bessel-Gauss comme faisceaux laser d'excitation en microscopie confocale dans le but d'augmenter la résolution de ce type de microscope. De plus l'utilisation de polarisations spécifiques nous a permis de générer différents faisceaux Bessel-Gauss compatibles avec la méthode d'augmentation de résolution SLAM, que nous avons donc améliorée.

### 1.1 Les faisceaux Bessel-Gauss et leurs utilisations

Les faisceaux Bessel ont l'avantage de combiner une longue profondeur de champ avec une faible largeur à mi-hauteur au point focal. Les faisceaux Bessel sont des solutions exactes à l'équation d'onde d'Helmholtz transportant une quantité infinie d'énergie. Ils ne peuvent donc exister physiquement. Les faisceaux Bessel-Gauss sont l'équivalent des faisceaux Bessel ayant une énergie finie. Ils conservent les propriétés les plus intéressantes des faisceaux Bessel, à savoir une longue profondeur de champ et un point focal fin, mais sur une distance finie.

Du fait de leur faible divergence [168,169] et de leur auto-reconstruction [170,171] les faisceaux Bessel sont utilisés dans un grand nombre d'approches de microscopie telles que la microscopie à feuillet de lumière [172,173], la microscopie à profondeur de champ augmentée [174–177] et les pièges à particules [178]. Ces faisceaux ont aussi été utilisés récemment en microscopie CARS (Coherent Anti-Stokes Raman Scattering) pour augmenter la résolution et en microscopie STED (STimulated Emission Depletion) pour conserver la même résolution sur une grande distance lors de l'imagerie d'échantillons épais [179] ou pour du STED à feuillet de lumière [180].

Du fait du plus petit point focal exhibé par les faisceaux Bessel, et par extension par les faisceaux Bessel-Gauss, leur utilisation en microscopie par balayage laser peut mener à une

augmentation de résolution du microscope. Notre objectif est d'utiliser les faisceaux Bessel-Gauss dans un microscope confocal pour obtenir cette augmentation de résolution transversale. Certains ont déjà utilisé des faisceaux Laguerre-Gauss d'ordre élevé en polarisation radiale, qui sont asymptotiquement équivalents aux faisceaux Bessel-Gauss en imagerie confocale [181–183]. Cependant, la présence de résidus des lobes secondaires dégrade souvent les images.

Une solution au problème des lobes secondaires serait l'utilisation de l'effet deux photons en incorporant le faisceau Bessel-Gauss dans un microscope deux photons. L'énergie présente dans les lobes secondaires en serait grandement diminuée et on imagerait avec une grande profondeur de champ [174].

La solution proposée ici est l'utilisation du sténopé du microscope confocal pour éliminer, à la détection, la fluorescence provenant des lobes secondaires et ne garder que la fluorescence du lobe central. L'utilisation du sténopé nous permet de garder le sectionnement optique donné par un microscope confocal. Les effets d'un sténopé à petit diamètre ont été analysés théoriquement sur des faisceaux Laguerre-Gauss d'ordre élevé en polarisation radiale [184].

Dans cette étude nous démontrons, à l'aide de résultats théoriques et expérimentaux sur des nano-sphères et des échantillons biologiques fixés avec différents marqueurs, que l'utilisation des faisceaux Bessel-Gauss en microscopie confocale permet d'en augmenter la résolution d'environ  $\approx 20\%$ . Ceci n'est possible qu'à condition d'utiliser un sténopé du bon diamètre (une unité d'Airy) pour garder la même distance de travail et rejeter la fluorescence provenant des lobes secondaires du faisceau Bessel-Gauss. De plus notre méthode, pour créer un faisceau Bessel-Gauss, ne nécessite pas un état de polarisation spécifique. Cela veut dire que nous pouvons utiliser différents états de polarisation du faisceau incident pour créer des faisceaux Bessel-Gauss d'ordres différents. Nous montrons également que les faisceaux Bessel-Gauss ainsi générés sont compatibles avec la technique d'augmentation de résolution SLAM (Switching LAser Modes) présentée en [107].

Ce chapitre se divise comme suit. Nous caractérisons d'abord numériquement nos faisceaux Bessel-Gauss et gaussiens en utilisant la théorie vectorielle de la diffraction présentée par Richards et Wolf [185]. Nous comparons ensuite les résultats expérimentaux aux faisceaux théoriques, montrant ainsi l'efficacité de la méthode pour générer des faisceaux Bessel-Gauss en microscopie confocale. Ensuite, nous démontrons l'efficacité des faisceaux Bessel-Gauss pour augmenter la résolution sur différents échantillons. Puis nous comparons l'utilisation des faisceaux Bessel-Gauss et gaussiens combinée avec la technique SLAM. Finalement, nous montrons que l'utilisation des faisceaux Bessel-Gauss lors de l'acquisition d'images permet de diminuer le taux de faux positifs d'une analyse statistique sur la colocalisation comparé à celui obtenu avec l'utilisation de faisceaux gaussiens.

## 1.2 Formalisme théorique et présentation du montage

### 1.2.1 Théorie vectorielle de diffraction de Richards et Wolf

Nous allons développer ici le formalisme théorique nous permettant de calculer les différentes composantes du champ électrique de nos faisceaux au plan focal de l'objectif. Étant donné que les objectifs utilisés en microscopie optique sont des objectifs de grande ouverture numérique, possédant donc de grands angles de focalisation pour des distances focales courtes, nous ne pouvons pas utiliser les théories dépendant de l'approximation paraxiale pour obtenir la distribution d'intensité de notre faisceau dans le plan focal. Plusieurs méthodes ont été proposées pour obtenir les composantes du champ électrique au plan focal de l'objectif [186–188], dont la méthode de diffraction vectorielle de Richards et Wolf [185, 189]. C'est cette dernière que nous avons choisi d'utiliser et qui nous donnera une représentation intégrale des composantes du champ électrique de nos faisceaux au plan focal en considérant la polarisation incidente et la forte ouverture numérique des objectifs de microscopie.

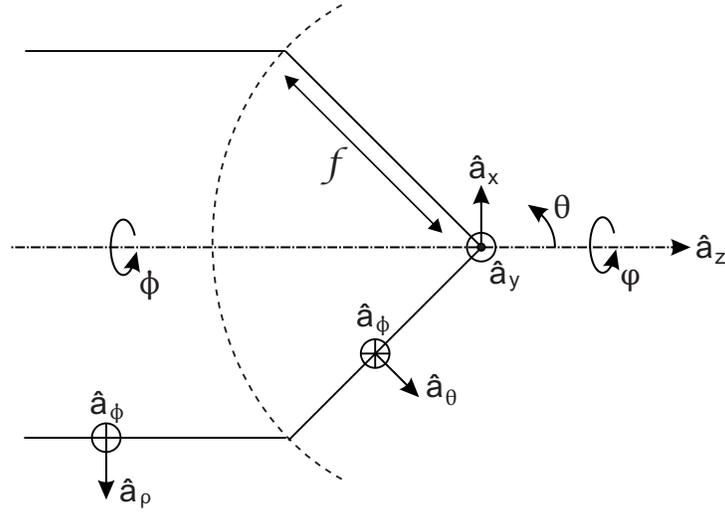


FIGURE 1.1 – Géométrie d'une lentille aplanétique avec le système de coordonnées utilisé dans la théorie de Richards et Wolf. Un objectif de microscopie sera ici approximé par une lentille aplanétique.

Pour faciliter la compréhension, la fig. 1.1 représente une vue de la géométrie de focalisation. Le faisceau incident est représenté en coordonnées cylindriques et le faisceau réfracté par l'objectif est représenté en coordonnées sphériques. Dans notre système, la sphère de référence transforme les coordonnées cylindriques du faisceau incident en coordonnées sphériques. Le point de départ pour le calcul de champ électromagnétique est l'équation de Richards et Wolf (1.1) qui représente le champ électrique au foyer de l'objectif (ou d'une lentille)  $\mathbf{E}(\rho, \varphi, z)$  comme une superposition d'ondes planes  $\exp(-i\mathbf{k} \cdot \mathbf{r})$ .

$$\mathbf{E}(\rho, \varphi, z) = \frac{E_0}{2\pi} \int_{\Omega} \int E_{\text{inf}}(\theta, \phi) \exp(-i\mathbf{k} \cdot \mathbf{r}) d\Omega \quad (1.1)$$

avec  $E_{\text{inf}}(\theta, \phi)$  le champ électrique réfracté par l'objectif qui s'écrit :

$$E_{\text{inf}}(\theta, \phi) = q(\theta) l_0(\theta, \phi) \hat{\mathbf{a}}(\theta, \phi) \quad (1.2)$$

où  $q(\theta) = \frac{1}{\sqrt{n}} \cos(\theta)^{\frac{1}{2}}$  est le facteur d'apodisation pour une lentille aplanétique,  $\hat{\mathbf{a}}(\theta, \varphi)$  le vecteur de polarisation et  $l_0(\theta, \varphi)$  la distribution d'amplitude réfractée par l'objectif.

En exprimant les coordonnées cartésiennes de chaque vecteur d'onde du faisceau réfracté en coordonnées sphériques, on obtient  $k_x = -k \sin \theta \cos \phi$ ,  $k_y = -k \sin \theta \sin \phi$  et  $k_z = k \cos \theta$  avec  $k$  le nombre d'onde. Le produit  $\mathbf{k} \cdot \mathbf{r}$  s'exprime donc :  $\mathbf{k} \cdot \mathbf{r} = kz \cos \theta - kr \sin \theta \cos(\varphi - \phi)$  et l'équation de Richards et Wolf s'écrit donc comme dans [189] :

$$\mathbf{E}(\rho, \varphi, z) = \frac{E_0}{2\pi} \int_0^{2\pi} \int_0^{\theta_{\text{max}}} \mathbf{E}_{\text{inf}}(\theta, \phi) \exp(-ikz \cos \theta) \exp(ik\rho \sin \theta \cos(\phi - \varphi)) \sin \theta d\phi d\theta \quad (1.3)$$

$f$  est la longueur focale de l'objectif et  $k = \frac{2\pi n}{\lambda}$  le nombre d'onde. L'angle  $\theta_{\text{max}}$  peut être calculé à partir de l'ouverture numérique selon  $\text{NA} = n \sin \theta_{\text{max}}$ .

Dans le cas d'un faisceau incident de polarisation linéaire (ici selon l'axe  $x$ ), les coordonnées du vecteur de polarisation après réfraction sont :

$$\begin{aligned} \hat{\mathbf{a}}(\theta, \varphi) &= \frac{1}{2} [(1 + \cos \theta) - (1 - \cos \theta) \cos(2\phi)] \hat{\mathbf{a}}_x \\ &+ \frac{1}{2} [-(1 - \cos \theta) \sin(2\phi)] \hat{\mathbf{a}}_y \\ &+ [-\sin \theta \cos \phi] \hat{\mathbf{a}}_z \end{aligned} \quad (1.4)$$

En utilisant les tables d'intégrales présentées en [190] :

$$\int_0^{2\pi} \exp(i\gamma \cos(\phi - \varphi)) \begin{cases} \cos(m\phi) \\ \sin(m\phi) \end{cases} d\phi = 2\pi i^m J_m(\gamma) \begin{cases} \cos(m\varphi) \\ \sin(m\varphi) \end{cases} \quad (1.5)$$

nous pouvons simplifier analytiquement les équations du champ électrique (éq. (1.3)) en résolvant l'intégrale selon  $\phi$ . Ici  $J_m$  représente la fonction de Bessel d'ordre  $m$ . L'expression finale du champ électrique contient maintenant une seule intégrale selon  $\theta$  et ses trois composantes s'écrivent :

$$\begin{aligned} E_x(\rho, \varphi, z) &= \frac{E_0}{2\sqrt{n}} \int_0^{\theta_{\text{max}}} \cos(\theta)^{\frac{1}{2}} l_0(\theta, \varphi) \exp(-ikz \cos \theta) \sin \theta \times \\ &[(1 + \cos \theta) J_0(k\rho \sin \theta) + (1 - \cos \theta) J_2(k\rho \sin \theta) \cos(2\varphi)] d\theta, \\ E_y(\rho, \varphi, z) &= \frac{E_0}{2\sqrt{n}} \int_0^{\theta_{\text{max}}} \cos(\theta)^{\frac{1}{2}} l_0(\theta, \varphi) \exp(-ikz \cos \theta) \sin \theta \times \\ &(1 - \cos \theta) J_2(k\rho \sin \theta) \sin(2\varphi) d\theta, \\ E_z(\rho, \varphi, z) &= \frac{iE_0}{\sqrt{n}} \int_0^{\theta_{\text{max}}} \cos(\theta)^{\frac{1}{2}} l_0(\theta, \varphi) \exp(-ikz \cos \theta) \sin \theta J_1(k\rho \sin \theta) \cos(\varphi) d\theta, \end{aligned} \quad (1.6)$$

avec, pour le faisceau gaussien,  $l_0(\theta, \varphi) = \exp\left(-\frac{(f \sin\theta)^2}{w^2}\right)$  où  $f = \frac{R}{\sin\theta_{\max}}$ ,  $R$  le rayon de la pupille d'entrée de l'objectif et  $w$  la taille du faisceau. Pour le faisceau Bessel-Gauss, nous illuminons l'ouverture arrière de l'objectif avec un faisceau annulaire. Nous supposons que ce faisceau annulaire est un anneau de lumière ayant un profil radial gaussien de largeur  $\Delta\theta$ , avec  $l_0(\theta, \varphi) = (\sqrt{\pi}\Delta\theta)^{-1} \exp\left(-\frac{(\theta-\theta_0)^2}{\Delta\theta^2}\right)$  la représentation mathématique de ce faisceau annulaire,  $\theta_0$  représentant l'angle de focalisation de cet anneau.  $J_0$ ,  $J_1$  et  $J_2$  représentent les fonctions de Bessel d'ordre 0, 1 et 2.

Bien que ces équations soient valides pour la focalisation dans un milieu unique, elles ne considèrent pas les interfaces entre deux milieux d'indices différents. Dans notre cas, comme dans beaucoup d'observations sur des échantillons *in vitro*, l'échantillon est fixé sur une lamelle de verre. Cette lamelle crée une interface avec le milieu de montage de l'échantillon. Puisque la distance de travail de notre objectif à immersion à eau d'ouverture numérique 1.2 (distance de 280  $\mu\text{m}$ ) est plus grande que la largeur de la lamelle (qui est de 150-170  $\mu\text{m}$ ), nous considérons seulement l'interface « verre - milieu de montage ». Pour considérer une interface, nous appliquons les conditions aux limites ([191]) aux composantes du champ électrique, calculées par la méthode de Richards et Wolf, avec  $\epsilon_1$  et  $\epsilon_2$  les permittivités relatives des deux milieux.

$$\begin{aligned} E_x^{\text{medium}_1} &= E_x^{\text{medium}_2} \\ E_y^{\text{medium}_1} &= E_y^{\text{medium}_2} \\ \epsilon_1 E_z^{\text{medium}_1} &= \epsilon_2 E_z^{\text{medium}_2} \end{aligned} \tag{1.7}$$

Avec ces équations, nous pouvons corriger la composante longitudinale (selon l'axe  $z$ ) du champ électrique pour prendre en compte le saut d'indice de réfraction en multipliant le champ électrique longitudinal par le terme :  $\frac{\epsilon_2}{\epsilon_1}$ . En supposant que les deux milieux sont non-magnétiques, nous avons  $\epsilon_1 = n_1^2 \epsilon_0$ ,  $\epsilon_0$  étant la permittivité du vide. Nous remplaçons donc  $\frac{\epsilon_2}{\epsilon_1}$  par  $\frac{n_2^2}{n_1^2}$ .

Nous avons également calculé numériquement les composantes du champ électrique au foyer en utilisant des intégrales de Richards et Wolf adaptées pour une focalisation proche d'une interface. Ces calculs sont présentés en annexe A. Bien que ces calculs soient plus exacts que l'approximation précédente, cette dernière nous donne un résultat suffisamment précis pour que nous décidions de la garder.

Dans le cas d'un faisceau incident de polarisation azimutale, le vecteur de polarisation après réfraction est :

$$\begin{aligned} \hat{\mathbf{a}}(\theta, \varphi) &= -\sin\phi \hat{\mathbf{a}}_x \\ &+ \cos\phi \hat{\mathbf{a}}_y \end{aligned} \tag{1.8}$$

En substituant cette expression de  $\hat{\mathbf{a}}(\theta, \varphi)$  dans l'équation (1.3) et en utilisant l'équation (1.5)

pour résoudre les intégrales, nous obtenons les composantes du champ électrique suivantes :

$$\begin{aligned}
 E_x(\rho, \varphi, z) &= -\frac{iE_0}{\sqrt{n}} \int_0^{\theta_{\max}} \cos(\theta)^{\frac{1}{2}} l_0(\theta, \varphi) \exp(-ikz \cos\theta) \sin(\theta)^2 J_1(k\rho \sin\theta) \sin(\varphi) d\theta, \\
 E_y(\rho, \varphi, z) &= \frac{iE_0}{\sqrt{n}} \int_0^{\theta_{\max}} \cos(\theta)^{\frac{1}{2}} l_0(\theta, \varphi) \exp(-ikz \cos\theta) \sin(\theta)^2 J_1(k\rho \sin\theta) \cos(\varphi) d\theta, \\
 E_z(\rho, \varphi, z) &= 0.
 \end{aligned}
 \tag{1.9}$$

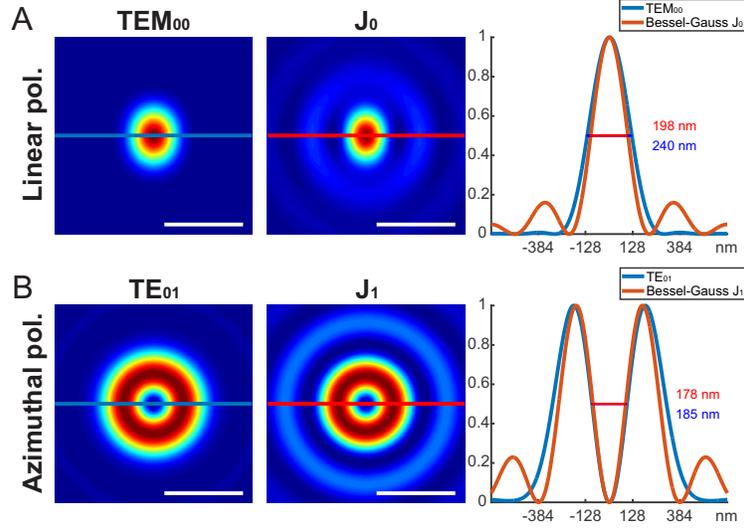


FIGURE 1.2 – Simulations numériques comparant les faisceaux Bessel-Gauss d’ordre 0 et 1 à un faisceau gaussien de polarisation verticale ( $TEM_{00}$ ) et à un faisceau Laguerre-Gauss de polarisation azimutale ( $TE_{01}$ ). *A/* Faisceau gaussien polarisé verticalement comparé au faisceau Bessel-Gauss d’ordre 0. *B/* Faisceau  $TE_{01}$  de polarisation azimutale comparé au faisceau Bessel-Gauss d’ordre 1 de polarisation azimutale. La colonne de droite représente les profils avec largeur à mi-hauteur des faisceaux. L’indice de réfraction de la lamelle est  $n_2 = 1.5$  et celui du milieu de montage est  $n_1 = 1.47$ . Barre d’échelle : 500 nm

La fig. 1.2 nous montre les distributions numériques des faisceaux gaussiens de polarisation verticale ( $TEM_{00}$ ), Laguerre-Gauss de polarisation azimutale ( $TE_{01}$ ), Bessel-Gauss d’ordre 0 de polarisation verticale et Bessel-Gauss d’ordre 1 de polarisation azimutale. Les graphiques de la fig. 1.2 montrent clairement que la largeur à mi-hauteur du faisceau Bessel-Gauss d’ordre 0 est 20% plus petite que celle du faisceau gaussien. Le faisceau Bessel-Gauss d’ordre 1 est lui aussi plus petit que le  $TE_{01}$ .

## 1.2.2 Montage expérimental

Pour obtenir ces faisceaux Bessel-Gauss expérimentalement, nous avons choisi la méthode proposée par [174] utilisant un axicon réfractif [192] et une lentille pour produire un anneau mince à profil gaussien. Nous utilisons ici un objectif ayant une grande ouverture numérique ( $NA = 1.2$ ) ce qui nous permet d’obtenir un faisceau très fin au point focal. La fig. 1.3 est

une représentation schématique du microscope utilisé, incluant le module d'augmentation de résolution avec l'axicon. Ce module est placé sur le chemin optique à l'entrée du microscope confocal. La lentille placée après l'axicon est utilisée pour effectuer la transformée de Fourier du faisceau Bessel-Gauss produit à la sortie de l'axicon et elle est placée à la distance focale des miroirs galvanométriques. Cette transformée de Fourier représente un anneau mince de profil gaussien qui est ensuite relayé jusqu'à l'ouverture arrière de l'objectif. En focalisant, l'objectif produit la transformée de Fourier inverse de cet anneau mince, créant ainsi un faisceau Bessel-Gauss au point focal. Le paragraphe suivant fournit une liste détaillée des éléments utilisés dans le montage.

Le laser d'excitation utilisé est un laser Compass 215M DPSS (Diode Pumped Solid State) de Coherent Inc ayant une longueur d'onde de 532 nm. L'objectif du microscope est un objectif Olympus à immersion à eau 60x UPlanSApo d'ouverture numérique  $NA = 1.2$ . Le PMT (Photomultiplier Tube) utilisé est un R3896 PMT monté sur un C7950 PMT DAP-type socket le tout de chez Hamamatsu. Les miroirs, cubes séparateurs et filtres ND (neutral density) de chez Thorlabs : miroirs P01, cubes séparateurs non polarisant BS010 50/50 (400 - 700 nm, 10 mm) et le kit de filtres ND NEK01. Les filtres dichroïques et d'excitation proviennent de Semrock : FF580-FDi01-25x36 et FF509-FDi01-25x36 pour la combinaison des lasers d'excitation, Di01-R405/488/532/635-25x36 pour la séparation entre excitation et émission ainsi que BLP01-488R-25, BLP01-647R-25 et BLP01-532R-25 comme filtres d'émission. Pour changer la polarisation de linéaire à azimutale et créer un faisceau en beigne, nous utilisons le convertisseur de polarisation de Arcoptix [193]. Ce convertisseur est placé sur un chemin optique parallèle au chemin optique principal de manière à passer facilement d'un état de polarisation à l'autre sans nécessiter d'alignement supplémentaire. Nous utilisons les cubes séparateurs 50/50 non polarisants pour séparer et recombinaison les deux chemins optiques. Nous avons également placé un iris pour nettoyer le faisceau laser avant l'axicon.

Nous avons choisi d'utiliser un axicon réfractif pour ses faibles pertes comparé à une ouverture annulaire [194] lors de la conversion d'un faisceau gaussien en faisceau Bessel-Gauss. La polarisation linéaire engendre un faisceau Bessel-Gauss d'ordre 0 et la polarisation azimutale un faisceau Bessel-Gauss d'ordre 1. L'axicon permet aussi de créer des faisceaux avec différentes polarisations, ce qui permet l'utilisation de faisceaux Bessel-Gauss de différents ordres. Dans toutes nos mesures expérimentales, l'axicon a un angle de déviation de  $\beta = 2.5$  degrés. Le diamètre de l'anneau à l'entrée de l'ouverture arrière de l'objectif est de 4.8 mm avec une largeur de 0.7 mm.

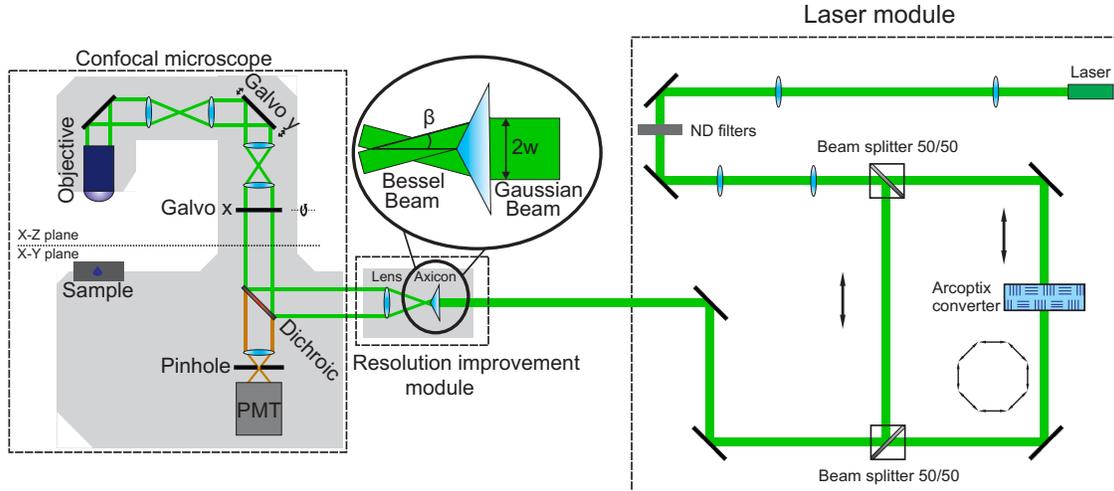


FIGURE 1.3 – Schéma simplifié représentant le microscope confocal avec la transformation du faisceau en faisceau Bessel-Gauss. La partie grossie permet d’insister sur la transformation effectuée par l’axicon. Dans cette partie,  $w$  représente la taille du faisceau gaussien traversant l’axicon et  $\beta$  l’angle du cône formé par les rayons réfractés par l’axicon. Le laser utilisé est un Compass 215M (avec une longueur d’onde de 532 nm) délivrant une puissance maximale de 40 mW, ce qui est largement suffisant pour notre application. Dans le module laser, nous utilisons deux séparateurs de faisceau pour créer et recombinaer deux chemins optiques parallèles nous permettant ainsi de commuter facilement entre les modes TEM<sub>00</sub> et TE<sub>01</sub>. Le faisceau TE<sub>01</sub> est créé en utilisant un convertisseur de polarisation radiale/azimutale de Arcoptix [193]. Les filtres ND sont des filtres à densité neutre. Les flèches dans la partie module laser du schéma indiquent l’état de polarisation : linéaire ou azimutale.

## 1.3 Focalisation de faisceaux Bessel-Gauss

### 1.3.1 Comparaisons avec les résultats théoriques

La fig. 1.4 montre les distributions d’intensité théorique des faisceaux Bessel-Gauss obtenues à l’aide des équations (1.1)-(1.2) et les compare aux PSF mesurées pour les polarisations linéaire et azimutale. On voit clairement une bonne correspondance entre les résultats expérimentaux (*gauche*) et théoriques (*milieu*). Les quatre maxima présents sur le premier lobe secondaire du faisceau Bessel-Gauss d’ordre 0 peuvent être dus à des imperfections sur l’axicon [195] ou à un angle d’incidence légèrement incliné [196].

### 1.3.2 Importance du sténopé

Les faisceaux Bessel-Gauss d’ordre 0 et 1 ont tous deux un lobe central plus petit que leur homologue gaussien TEM<sub>00</sub> / Laguerre-Gauss TE<sub>01</sub> (fig. 1.5-A/1-4). Cette propriété, ainsi que leur non-diffraction sur une plus longue distance, en font des faisceaux de choix pour remplacer les faisceaux gaussiens en microscopie. La fig. 1.5-B/1-3 nous montre l’effet de sténopés de différentes tailles sur la PSF du faisceau Bessel-Gauss d’ordre 0. On montre

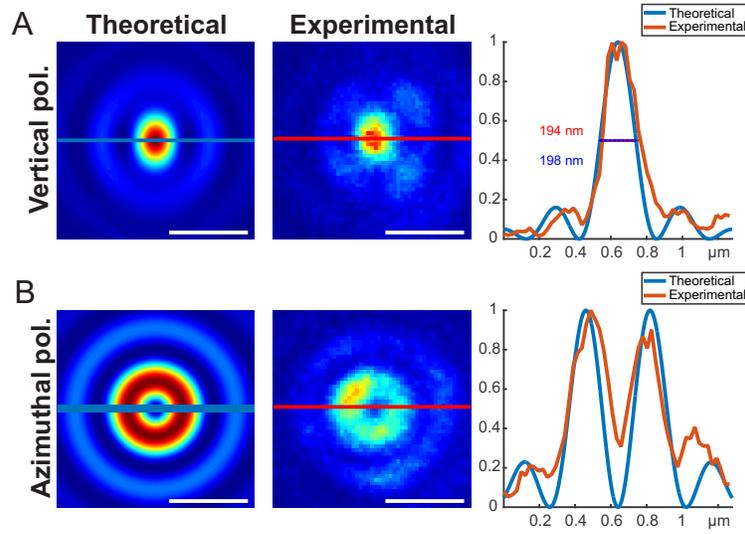


FIGURE 1.4 – Comparaison entre les distributions d’intensité théoriques (colonne de gauche) et expérimentales (colonne du milieu) des faisceaux Bessel-Gauss. *A/* Faisceau Bessel-Gauss d’ordre 0. *B/* Faisceau Bessel-Gauss d’ordre 1. Les PSF (Point Spread Function ou fonction d’étalement de point) expérimentales ont été mesurées sur des nano-sphères de 100 nm de diamètre (Fluosphere carboxylate-modified microspheres, orange fluorescence 540/560). La colonne de droite compare les profils et largeurs à mi hauteur (FWHM) des distributions théoriques et expérimentales. Barre d’échelle : 500 nm

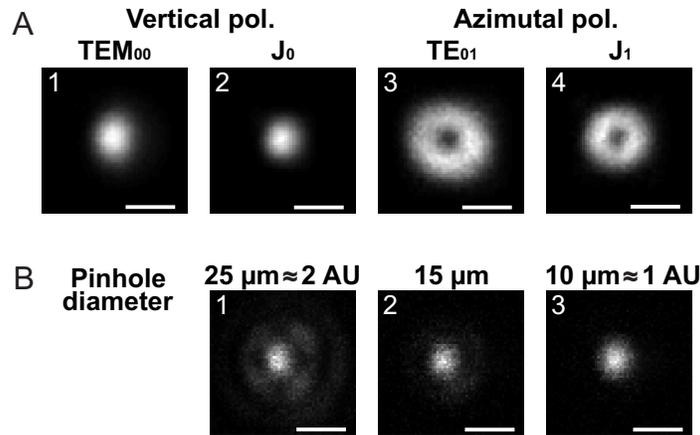


FIGURE 1.5 – *A/* Images des nano-sphères fluorescentes de 100 nm de diamètre observées au microscope confocal ayant un sténopé de 15  $\mu\text{m}$ . Ces nano-sphères sont observées à l’aide des faisceaux gaussien de polarisation verticale (*A/1*), Bessel-Gauss d’ordre 0 de polarisation verticale (*A/2*), Laguerre-Gauss de polarisation azimuthale  $\text{TE}_{01}$  (*A/3*) et Bessel-Gauss d’ordre 1 de polarisation azimuthale (*A/4*). *B/* Tache focale du faisceau Bessel-Gauss d’ordre 0 de polarisation verticale obtenue pour différents diamètres de sténopé : 25  $\mu\text{m}$  (*B/1*), 15  $\mu\text{m}$  (*B/2*) et 10  $\mu\text{m}$  (*B/3*). Longueur d’onde d’excitation 532 nm. Barre d’échelle : 500 nm

qu’avec un sténopé ayant un diamètre de l’ordre de l’Airy Unit ( $10 \mu\text{m}$ ), on supprime les effets dus aux lobes secondaires.

### 1.3.3 Caractérisation de la PSF

Pour caractériser notre système d’imagerie, nous utilisons un échantillon de nano-sphères fluorescentes de  $100 \text{ nm}$  de diamètre. Ces nano-sphères sont étalées sur une lamelle de verre puis fixées sur une lame de verre à l’aide du milieu de montage DAKO (ayant un indice de réfraction de  $1.47$ ). Nous observons ensuite cet échantillon avec nos différents faisceaux gaussiens et Bessel-Gauss pour comparer les largeurs à mi-hauteur des deux PSFs. Toutes les mesures ont été faites sur le microscope confocal présenté à la fig. 1.3 en utilisant un objectif à eau d’ouverture numérique  $\text{NA} = 1.2$ .

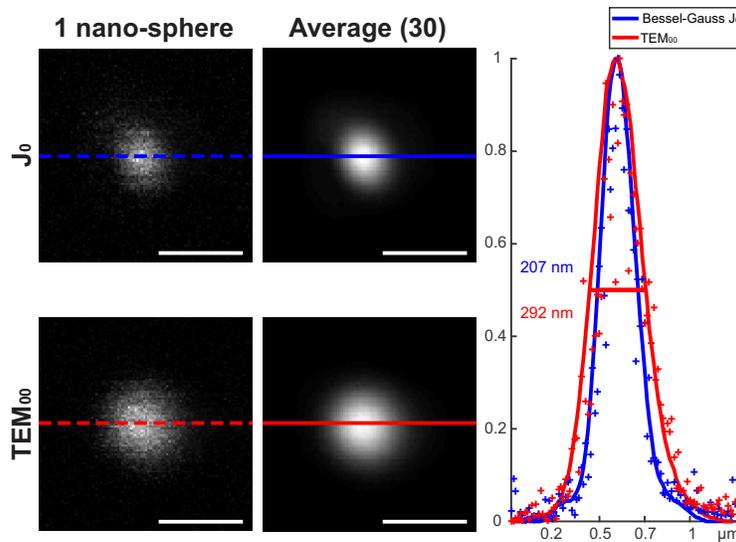


FIGURE 1.6 – Image confocale d’une nano-sphère unique puis d’une moyenne de  $\approx 30$  acquisitions de nano-sphères pour les deux faisceaux, gaussien et Bessel-Gauss d’ordre 0. Diamètre du sténopé :  $10 \mu\text{m}$ . Le panneau de droite nous montre les profils normalisés de ces mesures. La courbe avec la ligne pleine représente la mesure moyennée et les croix les valeurs de la mesure d’une nano-sphère unique. Barre d’échelle :  $500 \text{ nm}$

Nous pouvons voir à la fig. 1.6 l’amélioration sur la largeur à mi-hauteur des nano-sphères observées lorsque le faisceau Bessel-Gauss est utilisé. La largeur à mi-hauteur mesurée du faisceau gaussien est de  $292 \pm 12 \text{ nm} \approx 0.55 \lambda$  tandis que celle du faisceau Bessel-Gauss est de  $207 \pm 6 \text{ nm} \approx 0.39 \lambda$  (ce qui est seulement  $2\% \pm 3\%$  plus large que la largeur théorique de  $203 \text{ nm}$  de la fig. 1.2). L’amélioration mesurée ici (réduction relative de la largeur à mi-hauteur) est de  $\approx 29\% \pm 5\%$ .

Nous souhaitons maintenant caractériser la profondeur de champ du faisceau Bessel-Gauss. Pour cela, nous avons observé l’échantillon de nano-sphères à différentes profondeurs pour imaginer le faisceau Bessel-Gauss sur sa longue profondeur de champ. Cette observation a été

faite sur le microscope confocal avec un sténopé de  $25 \mu\text{m} \approx 2 \text{ AU}$  (Airy Unit). Étant donné que le sténopé coupe la profondeur de champ total du faisceau Bessel-Gauss, nous avons dû prendre plusieurs acquisitions du volume en déplaçant légèrement le sténopé pour observer différentes parties (en profondeur, selon l'axe optique) du faisceau Bessel-Gauss. Avec le sténopé, nous ne pouvons observer que  $\approx 4 \mu\text{m}$  de la profondeur de champ totale du faisceau Bessel-Gauss. Nous avons donc observé trois volumes à différentes profondeurs ce qui nous a permis d'acquérir le faisceau Bessel-Gauss sur la totalité de sa profondeur de champ, cf. fig. 1.7.

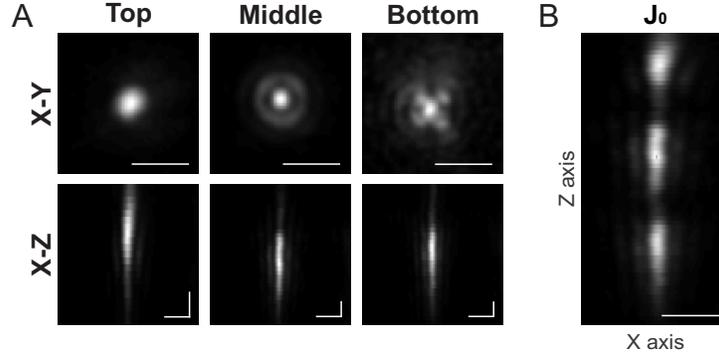


FIGURE 1.7 – *A/* Les trois volumes acquis mesurant chacun une partie du faisceau Bessel-Gauss sur une nano-sphère de  $100 \text{ nm}$  de diamètre. Sténopé :  $25 \mu\text{m}$ . Barre d'échelle :  $1 \mu\text{m}$ . *B/* Reconstruction du volume total montrant la forme et la profondeur de champ total du faisceau Bessel-Gauss à partir des trois acquisitions en *A/*.

La fig. 1.7 nous montre trois acquisitions volumétriques (en *A*) d'une nano-sphère montrant la forme du faisceau Bessel-Gauss à différentes profondeurs ainsi qu'une reconstruction montrant la profondeur de champ total (en *B*) combinant ces trois acquisitions. Les trois « zéros » présents le long de l'axe  $z$  dans la reconstruction sont dus au fait que les trois images ont été acquises avec un sténopé ; pour chaque acquisition l'intensité des plans proches de la limite définie par le sténopé est fortement réduite.

En utilisant les formules de profondeur de champ présentées en section 3 de [197], nous pouvons obtenir une valeur approximative de la profondeur de champ du faisceau Bessel-Gauss :

$$\text{profondeur de champ} \approx \frac{0.5774w}{\tan(\beta)}, \quad (1.10)$$

où  $\lambda$  est la longueur d'onde,  $w$  est la largeur du faisceau à l'entrée de l'axicon et  $\beta$  l'angle de focalisation des ondes planes créées par l'axicon permettant la formation du faisceau Bessel-Gauss.

Nous avons utilisé un axicon ayant un angle de  $2.5$  degrés et la lentille après l'axicon possède une longueur focale de  $10 \text{ cm}$ . La longueur d'onde est de  $532 \text{ nm}$ . L'objectif a une ouverture numérique de  $\text{NA} = 1.2$  et la largeur du faisceau à l'entrée de l'axicon est d'environ  $1.2 \text{ mm}$ . Dans ces conditions, nous devrions avoir une profondeur de champ de  $13 \mu\text{m}$ .

D'après la fig. 1.7 nous pouvons voir que la partie supérieure du faisceau Bessel-Gauss a un profil latéral plutôt gaussien, que le faisceau se construit petit à petit en descendant et que les premiers lobes secondaires apparaissent. Dans la partie centrale, les lobes secondaires sont parfaitement construits et on obtient bien un faisceau du type Bessel-Gauss. Dans la partie basse, le défaut de l'axicon et les aberrations commencent à avoir un impact sur la forme du faisceau. On commence à perdre de la puissance et les lobes secondaires sont de plus en plus intenses. Du fait de la forme de ce faisceau Bessel-Gauss, nous voulons que notre sténopé sélectionne seulement la zone centrale où le faisceau Bessel-Gauss est bien formé et de bonne qualité.

Finalement, nous avons pu mesurer une largeur à mi-hauteur de  $\approx 208 \text{ nm} \pm 6 \text{ nm} \approx 0.39 \lambda$  et une profondeur de champ de  $\approx 14 \mu\text{m} \pm 0.48 \mu\text{m} \approx 26 \lambda$ . Nous avons donc une largeur à mi-hauteur expérimentale seulement  $2.5\% \pm 3\%$  supérieure à la valeur la théorique de 203 nm (fig. 1.2) et une profondeur de champ  $7\% \pm 3\%$  plus longue que la valeur théorique de  $13 \mu\text{m}$  (équation (1.10)).

Bien que le faisceau Bessel-Gauss soit non-diffractant sur une longue distance et qu'il possède donc une grande profondeur de champ, le sténopé du microscope confocal nous permet de garder le même sectionnement axial ( $1 \mu\text{m} \approx 2 \lambda$  lorsqu'un sténopé de 1 AU est utilisé) que celui obtenu avec un faisceau gaussien. Les profils d'intensité à la fig. 1.8 nous montrent la largeur axiale des deux PSF ; elle est de  $1.1 \pm 0.12 \mu\text{m}$  pour le faisceau gaussien et de  $1.2 \pm 0.12 \mu\text{m}$  pour le faisceau Bessel-Gauss.

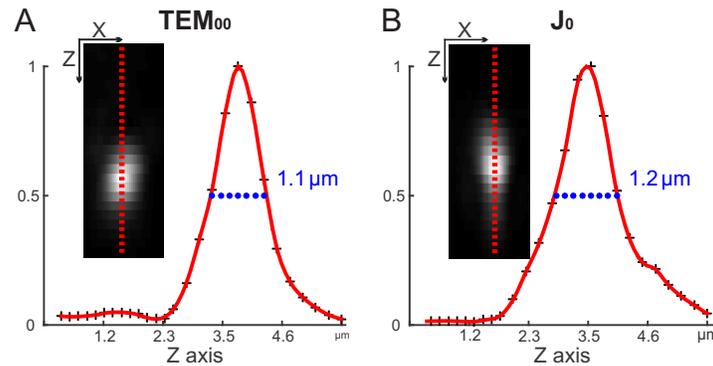


FIGURE 1.8 – Vue axiale des PSF mesurées sur les nano-sphères pour les deux faisceaux. *A/* Faisceau gaussien de polarisation linéaire verticale. *B/* Faisceau Bessel-Gauss d'ordre 0 de polarisation linéaire verticale. Les images encadrées dans les courbes représentent des vues axiales de la PSF. Les courbes sont des profils d'intensité le long de la ligne rouge pointillée sur l'image correspondante. Les croix noires sur les courbes représentent les valeurs des pixels avant interpolation, en rouge. Taille du pixel selon l'axe x : 24 nm. Taille du pixel selon l'axe z : 250 nm.

## 1.4 Augmentation de résolution en microscopie confocale

Dans cette section, nous mettrons l'accent sur la comparaison de la résolution obtenue en microscopie confocale utilisant les faisceaux Bessel-Gauss et gaussien. Nous mesurerons cette résolution sur des échantillons de nano-sphères et sur des échantillons biologiques fixés dont l'un ayant reçu un marquage pour les microtubules, qui sont des structures biologiques couramment utilisées pour les mesures de résolution.

### 1.4.1 Mesures sur des nano-sphères

Nous utilisons ici le même échantillon de nano-sphères que précédemment (nano-sphères fluorescentes de 100 nm de diamètre). La PSF correspondante et le profil du faisceau ont été présentés à la fig. 1.6.

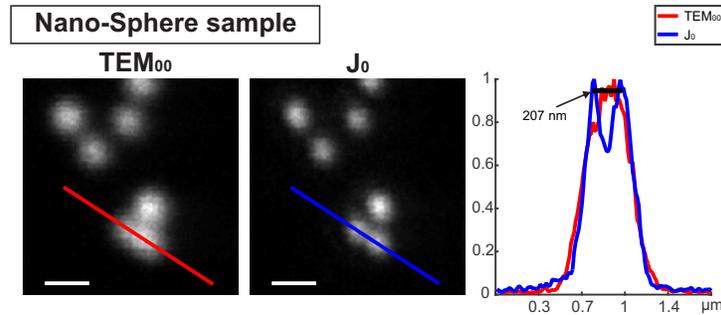


FIGURE 1.9 – Image confocale du même champ de nano-sphères observé avec les faisceaux gaussien (*gauche*) et Bessel-Gauss (*centre*). *Droite* : profils normalisés pris le long des lignes de couleurs sur les deux images. La ligne noire du panneau de droite met en évidence la mesure de résolution entre les deux maxima. Diamètre du sténopé : 10  $\mu\text{m}$ . Barre d'échelle : 510 nm. Les images sont filtrées avec un filtre gaussien ayant une largeur à mi-hauteur de 1 pixel.

Nous pouvons voir, à la fig. 1.9, l'augmentation de résolution apportée par le faisceau Bessel-Gauss. Le panneau central nous montre une résolution de  $\approx 207 \pm 12 \text{ nm} \approx 0.39 \lambda$  pour le faisceau Bessel-Gauss, ce qui est en dessous de la résolution limite prévue par le critère de Rayleigh, qui est de  $1.22 \frac{\lambda}{2NA} \approx 270 \text{ nm} \approx 0.51 \lambda$ , avec  $\lambda$  la longueur d'onde et NA l'ouverture numérique. L'amélioration relative de la résolution est de  $\approx 23\%$ .

### 1.4.2 Mesures sur des échantillons biologiques

Nous montrons ici l'amélioration de résolution apportée par le faisceau Bessel-Gauss sur un échantillon montrant des microtubules marqués en fluorescence. Les microtubules, compte tenu de leur faible diamètre ( $\approx 25 \text{ nm}$ ), sont des structures biologiques typiques à observer pour caractériser la résolution.

Les profils montrés à la fig. 1.10 sont des profils intégrés le long d'une ligne de 5 pixels de large. Ici aussi nous observons clairement l'amélioration de la résolution entre le faisceau gaussien et

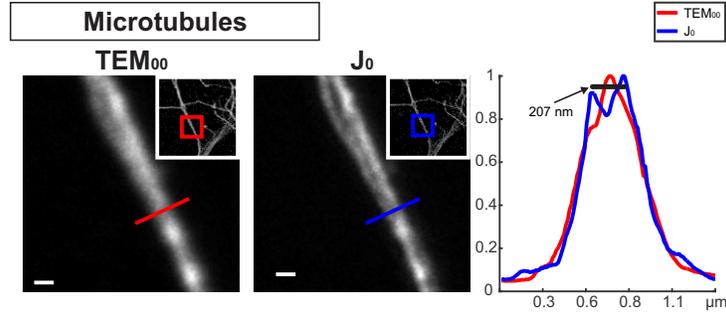


FIGURE 1.10 – Image confocale du même champ de microtubules marqués par immunohistochimie (Ms anti-acetylated / tubuline - Dk anti-Ms RRX) et observé avec les faisceaux gaussien (*gauche*) et Bessel-Gauss (*centre*). *Droite* : profils normalisés pris le long des lignes de couleurs sur les deux images. La ligne noire du panneau de droite met en évidence la mesure de résolution entre les deux maxima. Diamètre du sténopé :  $10 \mu\text{m}$ . Barre d'échelle :  $510 \text{ nm}$ . Les images sont filtrées avec un filtre gaussien ayant une largeur à mi-hauteur de 1 pixel.

le faisceau Bessel-Gauss. La résolution mesurée avec le faisceau Bessel-Gauss est de  $207 \pm 12 \text{ nm} \approx 0.39 \lambda$ , ce qui est meilleur que la résolution théorique obtenue avec un faisceau gaussien, qui est de  $\approx 270 \text{ nm} \approx 0.51 \lambda$ . L'amélioration relative de la résolution est de  $\approx 23\%$ .

Nous avons également mesuré l'amélioration de résolution due au faisceau Bessel-Gauss sur un autre échantillon biologique. Pour cet échantillon, nous avons choisi d'utiliser un marqueur de synapses neuronales. Nous avons donc révélé par immunofluorescence la protéine gephyrin qui est un marqueur des synapses inhibitrices dans les neurones, présente sous forme d'amas à la surface de la membrane cellulaire. Nous montrons une amélioration de la résolution de ces amas de gephyrin, et par là même, une amélioration de la résolution au niveau des contacts synaptiques inhibiteurs.

La fig. 1.11 montre que le faisceau Bessel-Gauss résout plus de sites contenant de la gephyrin que le faisceau gaussien. Nous obtenons une résolution de  $\approx 219 \pm 12 \text{ nm} \approx 0.41 \lambda$  avec le faisceau Bessel-Gauss, ce qui donne une amélioration relative de la résolution de  $\approx 20\%$  par rapport au faisceau gaussien, qui a une résolution théorique de  $\approx 270 \text{ nm}$ .

## 1.5 Procédure d'alignement

### 1.5.1 Alignement du microscope

En microscopie optique à balayage laser, l'alignement des éléments optiques qui compose le microscope est critique pour obtenir une image de qualité. En effet, si le faisceau laser permettant l'imagerie est mal acheminé jusqu'à l'objectif, l'intensité du signal peut fortement diminuer, affectant le rapport signal à bruit de l'instrument. De plus, la résolution peut en souffrir. Pour s'assurer que le faisceau laser reste de bonne qualité sur la totalité du trajet

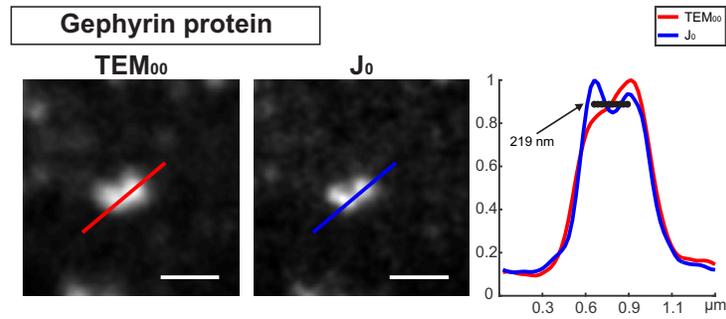


FIGURE 1.11 – Protéine gephyrin détectée à l’aide d’un anticorps monoclonal mAb7a couplé à la protéine fluorescente Oyster 550 ayant un maximum d’excitation à 551 nm. Images obtenues avec le faisceau gaussien (*gauche*) et avec le faisceau Bessel-Gauss (*centre*). *Droite* : profils normalisés pris le long des lignes de couleurs sur les deux images. La ligne noire du panneau de droite met en évidence la mesure de résolution entre les deux maxima. Diamètre du sténopé : 10  $\mu\text{m}$ . Barre d’échelle : 1  $\mu\text{m}$ . Les images sont filtrées avec un filtre gaussien ayant une largeur à mi-hauteur de 1 pixel.

optique, il est important de définir une méthode pour aligner les éléments optiques et minimiser ainsi les pertes et aberrations. La méthode que nous utilisons ici consiste à faire passer le faisceau laser par deux iris centrés sur le chemin optique et à regarder, avec une caméra, les figures d’interférences produites lorsque ces iris sont partiellement fermés. La fig. 1.12 montre en *A* un schéma simplifié de l’emplacement placement des deux iris et de la caméra sur le trajet optique et en *B* des exemples de ce que l’on observe à la caméra lorsque le faisceau laser est correctement aligné ou non.

Ces deux iris sont placés après un miroir sur le chemin optique et le miroir est ensuite ajusté pour aligner le faisceau laser au centre des iris. Une fois le miroir aligné, si des lentilles formant un des télescopes du microscope sont présentes après ce miroir, elles sont mises en place et ajustées de manière à garder le faisceau centré sur les iris. Les iris sont ensuite déplacés pour ajuster le miroir suivant et l’opération est répétée pour tous les miroirs et télescopes du microscope. Les miroirs galvanométriques ne font pas exception.

L’intérêt de cet alignement est de s’assurer que le faisceau laser arrive bien à 45 degrés sur les miroirs et qu’il passe bien au centre de chaque lentille.

### 1.5.2 Alignement du sténopé et de l’axicon

Une fois le faisceau laser d’excitation aligné, il reste à aligner le système de détection. Pour cela, une des premières étapes est de placer une lame fluorescente sous l’objectif au niveau de l’échantillon et de l’imager. La fluorescence émise est utilisée comme guide pour placer le sténopé et sa lentille ainsi que le détecteur (PMT). L’ajustement fin se fait en observant cette lame de fluorescence et en ajustant la lentille et le sténopé pour maximiser l’intensité et

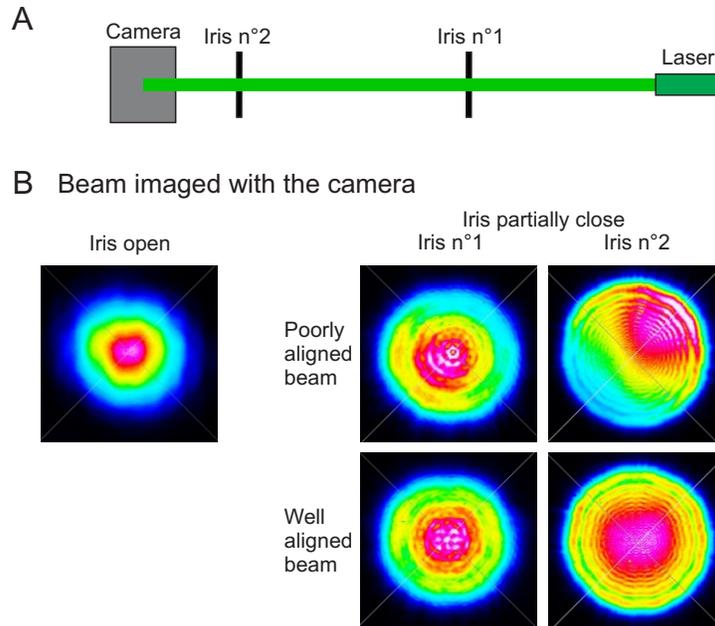


FIGURE 1.12 – *A/* Schéma simplifié des outils utilisés lors de l’alignement du faisceau laser entre deux miroirs. Les deux iris sont placés pour s’assurer de l’alignement du laser. *B/* Exemples d’images du faisceau gaussien  $TEM_{00}$  au niveau de la caméra lorsque l’un des deux iris est fermé et que le faisceau est bien ou mal aligné.

l’uniformité du signal dans le champ de vue (voir fig. 1.13-*A*). Une fois ce premier ajustement fait, il faut changer d’échantillon et passer sur un échantillon de nano-sphères pour effectuer un réglage fin de la position du sténopé et de la lentille qui lui est associée. Les nano-sphères utilisées sont des nano-sphères fluorescentes de 100 nm de diamètre, ce qui est suffisamment petit pour que chaque nano-sphère représente une image du faisceau laser au point focal (le faisceau laser fait environ 250 nm de diamètre). L’ajustement du sténopé permet de centrer le faisceau dans le plan (x-y) pour maximiser l’intensité. L’ajustement de la lentille permet de sélectionner la bonne tranche optique pour avoir un faisceau le plus intense possible avec une taille minimale.

Il est également bon de vérifier que le groupe lentille, sténopé et détecteur, est correctement aligné sur l’axe optique en balayant l’échantillon de nano-sphères fluorescentes selon l’axe z (axe optique). Si un décalage dans le plan (x-y) est visible entre les différentes tranches optiques durant le balayage selon l’axe z, le groupe lentille, sténopé et détecteur, doit être déplacé ou orienté différemment pour corriger ce problème. Bien évidemment, après chaque déplacement ou réorientation, il est nécessaire de réaligner le sténopé. Il est également possible que ce défaut (décalage dans le plan (x-y) en fonction la tranche optique) soit dû à un mauvais alignement des miroirs et lentilles acheminant le laser entre le miroir dichroïque et l’objectif. Il est donc conseillé de vérifier cet alignement avant d’entreprendre un ajustement fin et plus complexe

de l'ensemble de détection.

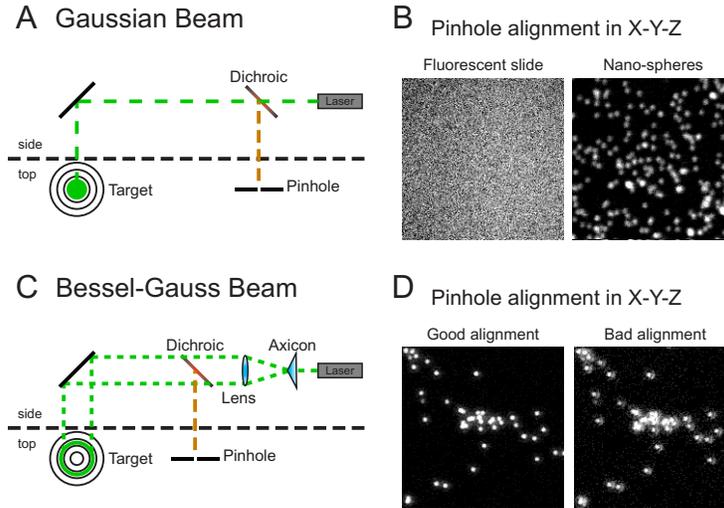


FIGURE 1.13 – *A/* Procédure d’alignement du sténopé. Une cible est placée à la place de l’objectif pour centrer le faisceau laser. L’objectif est remis et une lame fluorescente est imagée sous l’objectif et on maximise l’intensité en déplaçant le sténopé. Un ajustement fin est ensuite effectué sur un échantillon de nano-sphères. *B/* Exemples d’images de la lame de fluorescence ainsi que des nano-sphères fluorescentes utilisées durant la procédure d’alignement. *C/* Pour aligner l’axicon, la cible est d’abord placée et centrée à la place de l’objectif. L’axicon et la lentille sont ensuite placés et alignés en fonction de leur effet et réflexion sur le chemin optique (centrée sur un iris). La lentille est utilisée ensuite pour centrer finement l’anneau formé par l’axicon sur la cible. Le sténopé est aligné en observant un échantillon de nano-sphères ; les lobes secondaires ne doivent plus apparaître. *D/* Exemple d’images de nano-sphères observées avec le faisceau Bessel-Gauss lorsque le sténopé est bien ou mal aligné.

Pour obtenir un faisceau Bessel-Gauss, il faut rajouter l’axicon et sa lentille adjointe dans le chemin optique, avant le miroir dichroïque permettant la séparation entre le laser d’excitation et la fluorescence d’émission. Pour aligner ces éléments optiques correctement, il faut d’abord centrer une cible sur le faisceau laser au niveau de l’échantillon en ayant auparavant retiré l’objectif. Une fois la cible placée, on place l’axicon et la lentille de manière à avoir un anneau de lumière symétrique et centré sur la cible (voir fig. 1.13-*C*). L’anneau de lumière est bien symétrique (symétrie radiale) lorsque l’axicon est bien centré sur le faisceau incident et l’anneau est centré sur la cible lorsque la lentille est correctement positionnée. Il est ensuite nécessaire de reprendre la procédure permettant d’aligner le sténopé en observant d’abord la lame fluorescente et ensuite les nano-sphères fluorescentes. Attention cependant à la longueur du faisceau Bessel-Gauss, i.e. sa profondeur de champ, qui rend difficile l’obtention de la bonne section optique avec la lame fluorescente. La majorité de l’alignement se fait sur l’échantillon de nano-sphères fluorescentes.

Il est également nécessaire de vérifier si le faisceau Bessel-Gauss est bien droit dans l’échantillon. Pour cela, il faut balayer l’échantillon de nano-sphères fluorescentes selon l’axe  $z$  et cor-

riger tout décalage dans le plan x-y en ajustant finement la lentille positionnée après l'axicon. Comme l'ensemble lentille, sténopé et détecteur a déjà été aligné sur l'axe optique précédemment avec le faisceau gaussien classique, c'est donc le groupement lentille axicon qu'il faut ajuster. Cependant, le sténopé doit tout de même être finement réajusté à chaque ajustement de la lentille pour vérifier si le faisceau Bessel-Gauss est bien droit selon l'axe optique (axe z).

La fig. 1.13-D compare deux exemples d'alignement du sténopé, l'un correct et l'autre non puisqu'on y voit encore les lobes secondaires du faisceau Bessel-Gauss.

## 1.6 Applications et contraintes

### 1.6.1 Augmentation de résolution pour une meilleure colocalisation entre deux marqueurs proches

Un des défis les plus importants en microscopie confocale est la capacité à distinguer différentes structures présentes dans les cellules et organelles. La plupart de ces structures sont plus petites que le faisceau laser utilisé en microscopie confocale et ne peuvent donc pas être résolues. Pour mesurer l'impact de l'amélioration de la résolution nous avons utilisé deux marqueurs différents pour localiser deux structures, chacune d'un côté différent des synapses neuronales. Nous avons choisi cette étude car ces structures sont bel et bien séparées mais suffisamment proches pour que leur discernement devienne problématique. En effet, les sites pré- et post-synaptiques sont séparés par un espace extra-cellulaire appelé la fente synaptique qui est large de  $\approx 20-50$  nm, rendant leur distinction difficile avec une résolution de 270 nm.

Nous avons décidé ici de détecter les structures pré- et post-synaptiques en marquant deux différentes protéines. La première protéine d'intérêt est localisée dans la zone pré-synaptique et est appelée Glutamic Acid Decarboxylase (GAD). Cette protéine est une enzyme qui transforme le glutamate en GABA rendant la synapse inhibitrice. La seconde protéine est la gephyrin, qui est une protéine d'attache des récepteurs GABA<sub>A</sub> du côté post-synaptique des synapses inhibitrices. Pour analyser les images et avoir une estimation de la présence au même endroit des deux protéines, nous utilisons un algorithme d'analyse statistique de colocalisation [198]. Le problème principal avec ces deux protéines est que l'analyse des images révèle un certain degré de colocalisation entre elles, indiquant qu'elles sont interprétées comme étant dans la même zone, alors qu'elles sont physiquement séparées par la fente synaptique. Une raison à ce problème est le manque de résolution.

La fig. 1.11 montre que nous pouvons résoudre plus de sites post-synaptiques en utilisant les faisceaux Bessel-Gauss. Nous voulons maintenant vérifier que l'augmentation de résolution due au faisceau Bessel-Gauss sur les marqueurs pré- et post-synaptiques (GAD *vs.* gephyrin) nous permet de réduire la détection de faux positifs en colocalisation. La fig. 1.14 nous montre une comparaison de l'analyse de colocalisation entre les marqueurs gephyrin et GAD d'images

de neurones prises avec les faisceaux gaussien et Bessel-Gauss (fig. 1.14-A).

L'outil d'analyse utilise la résolution et le rapport signal à bruit des images pour créer un masque binaire de chaque protéine. Les masques représentent la zone où l'algorithme a détecté la présence de la protéine d'intérêt. L'algorithme calcule ensuite la superposition des deux masques représentant les deux protéines et utilise la surface de chaque masque pour normaliser les résultats de superposition. Cette superposition est ensuite comparée à la superposition théorique espérée entre deux masques de même surface répartis aléatoirement. La valeur finale donnée par cet algorithme, qui permet d'estimer la colocalisation, est appelée l'indice. L'indice est calculé en prenant la différence entre la valeur de la surface de superposition des masques et celle de la superposition des deux masques de taille identique répartis aléatoirement. Cet indice est normalisé en pourcentage de superposition ; plus l'indice est petit, moins il y a de colocalisation.

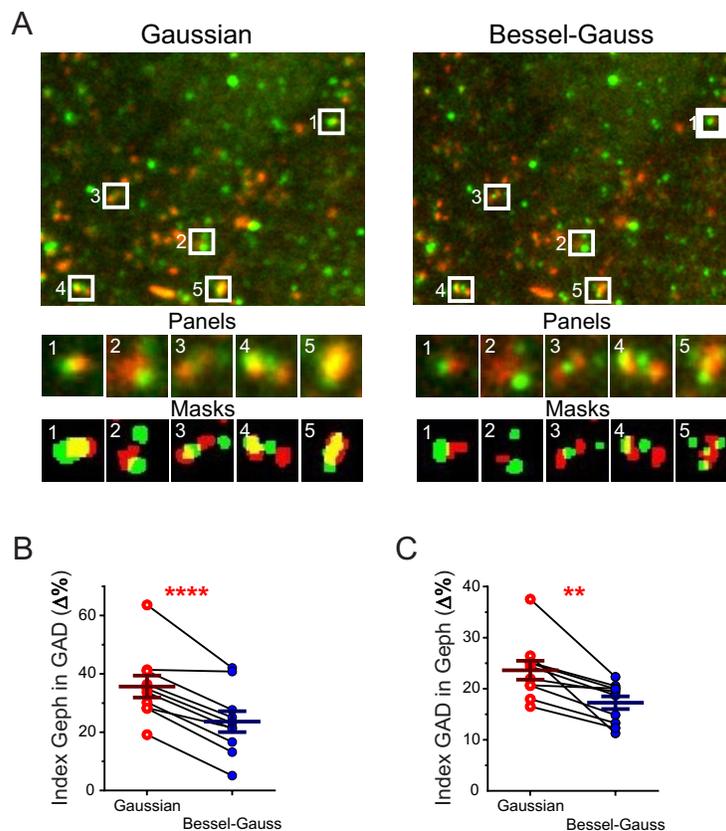


FIGURE 1.14 – A/ Deux images du même champ prises en microscopie confocale avec les faisceaux gaussien et Bessel-Gauss ainsi que quelques zones agrandies avec leurs masques associés (la création des masques est une étape de l'analyse [198]). Le contraste des images a été ajusté pour une meilleure visibilité mais les données brutes ont été utilisées pour l'analyse. B/-C/ Comparaison de l'indice (Index sur les graphiques) obtenu pour les acquisitions avec faisceaux gaussien et Bessel-Gauss du même champ. Un indice plus petit correspond à une plus faible colocalisation. Les indices ont été comparés avec un t-test jumelé.

La fig. 1.14-*A* nous montre quelques exemples de l'amélioration de résolution obtenue grâce au faisceau Bessel-Gauss : la superposition entre les deux masques est plus faible avec le faisceau Bessel-Gauss. Les fig. 1.14-*B* et 1.14-*C* comparent les indices obtenus avec l'analyse des images prises avec les faisceaux gaussien et Bessel-Gauss. Pour les deux protéines, gephyrin en *B* avec  $p < 0.0001$  et GAD en *C* avec  $p < 0.0027$ , l'indice obtenu en utilisant le faisceau Bessel-Gauss est significativement plus petit que celui obtenu en utilisant le faisceau gaussien. Le seuil de significativité utilisé est  $\alpha = 0.05$ . Cet indice est plus petit de  $\approx 30 \pm 5 \%$ , ce qui est cohérent avec la réduction de la largeur à mi-hauteur du faisceau de  $\approx 20 \%$ , ce qui réduirait la surface du faisceau de  $\approx 36 \%$ , l'indice étant calculé à partir de surfaces. Ces résultats montrent qu'une amélioration de 20 % en résolution avec les faisceaux Bessel-Gauss permet une amélioration encore plus grande en ce qui concerne l'analyse de colocalisation sur ces images.

### 1.6.2 B-SLAM

Dans cette section nous allons appliquer les faisceaux Bessel-Gauss à une technique d'augmentation de résolution basée sur différentes formes de faisceaux en microscopie confocale : la microscopie SLAM (section 0.2.8). Nous avons sélectionné cette technique car les faisceaux Bessel-Gauss sont compatibles avec les formes de faisceaux nécessaires pour le fonctionnement de cette technique. Nous remplacerons ici le mode gaussien de polarisation verticale  $TEM_{00}$  par un mode Bessel-Gauss d'ordre 0 de polarisation verticale et le mode Laguerre-Gauss de polarisation azimutale  $TE_{01}$  par un faisceau Bessel-Gauss d'ordre 1 de polarisation azimutale.

Les deux faisceaux Bessel-Gauss étant plus petits que les deux autres faisceaux utilisés normalement, à savoir  $TEM_{00}$  et  $TE_{01}$ , leur utilisation en microscopie confocale permet d'augmenter l'efficacité de la technique SLAM et d'augmenter encore plus la résolution des images. Nous gardons ici le même sténopé de 10  $\mu\text{m}$  pour toutes les images, ce qui permet de couper les lobes secondaires des faisceaux Bessel-Gauss et de garder la même profondeur de champ.

#### Comparaison entre la microscopie SLAM et B-SLAM sur un échantillon de nano-sphères

En regardant les images et profils à la fig. 1.15, nous voyons que la méthode B-SLAM permet d'obtenir une meilleure résolution que la méthode SLAM classique. La méthode B-SLAM arrive clairement à résoudre deux nano-sphères collées qui n'étaient pas distinguées par la méthode SLAM. Nous mesurons une résolution de  $\approx 106 \pm 12 \text{ nm}$ .

#### Comparaison entre la microscopie SLAM et B-SLAM sur un échantillon biologiques fixé

Nous allons tester ici l'amélioration apportée par la méthode B-SLAM sur des échantillons fixés avec un marquage pour les microtubules. Les profils montrés à la fig. 1.16 sont des profils intégrés sur une ligne de 10 pixels de large. Nous pouvons, sur cette image, distinguer plus de détails avec la méthode B-SLAM qu'avec la technique SLAM seule.

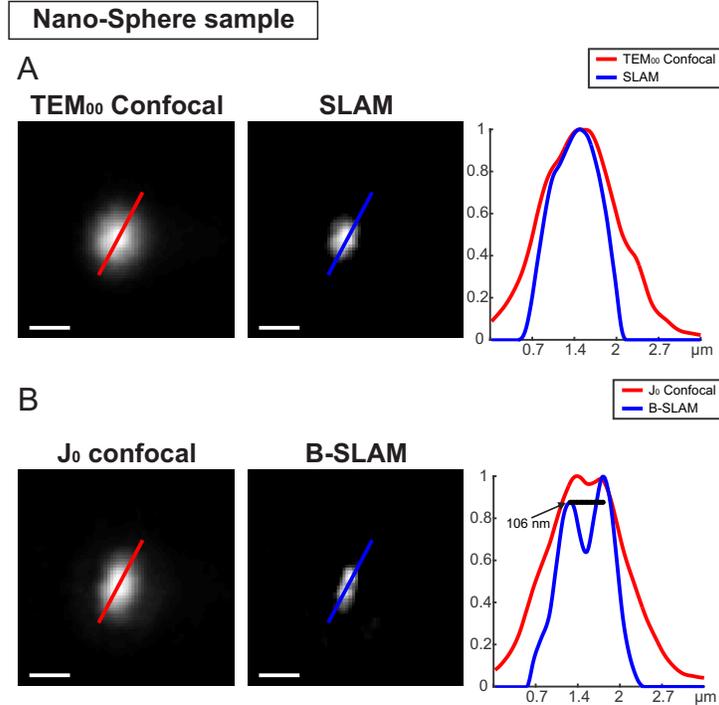


FIGURE 1.15 – La méthode SLAM est appliquée à des images de nano-sphères en utilisant les faisceaux classiques en *A*) (avec  $g = 0.9$ ) et les faisceaux Bessel-Gauss en *B*) (avec  $g = 1.0$ ). *Gauche* : images confocales (avec faisceaux gaussien et Bessel-Gauss). *Centre* : images SLAM et B-SLAM. *Droite* : profils normalisés pris le long des lignes de couleurs sur les images. La ligne noire sur le profil B-SLAM en *B*) met en évidence la mesure de résolution entre les deux maxima. Diamètre du sténopé :  $10 \mu\text{m}$ . Barre d'échelle :  $300 \text{ nm}$ .

Nous avons montré ici que la méthode proposée utilisant les faisceaux Bessel-Gauss peut être combinée avec la méthode SLAM pour en augmenter l'amélioration de résolution obtenue.

### 1.6.3 Caractérisation du photoblanchiment

Pour comparer clairement la microscopie confocale avec les faisceaux Bessel-Gauss à la microscopie confocale à faisceau gaussien classique, nous avons étudié l'effet de photoblanchiment lié à chacun des deux faisceaux. Pour mesurer ce photoblanchiment nous illuminons de façon continue une zone dans un échantillon de culture cellulaire, avec un marquage des microtubules, pendant une période de 10 minutes. Pendant ce temps, nous prenons à chaque minute des images de la zone illuminée et d'une zone élargie autour qui n'a pas reçu l'illumination continue. Pour chaque acquisition nous calculons le ratio des intensités entre la zone illuminée et la zone non illuminée ; ces ratios sont ensuite normalisés. Nous répétons ensuite le processus sur une gamme de puissances laser différentes ; la puissance est mesurée à l'entrée de l'objectif du microscope confocal. Le processus total est répété une seconde puis une troisième fois et ensuite les résultats sont moyennés.

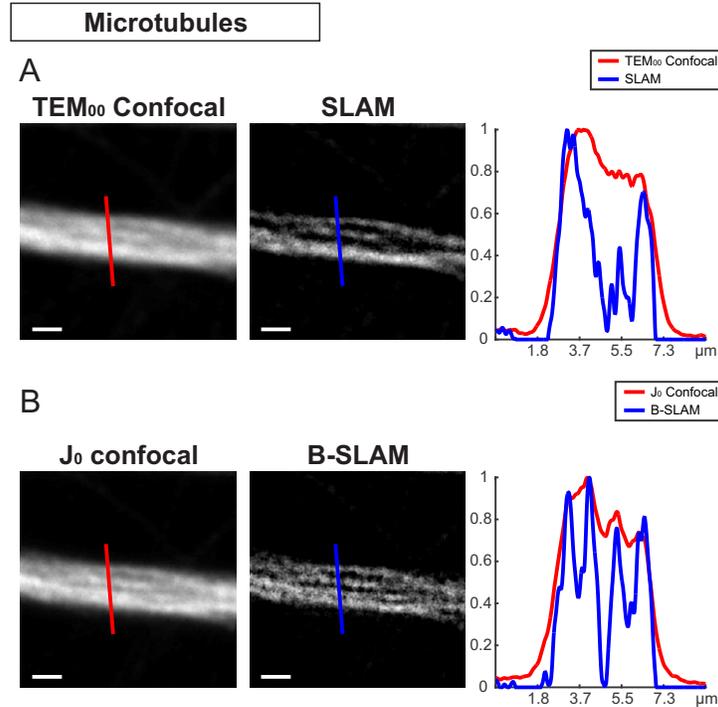


FIGURE 1.16 – La méthode SLAM est appliquée à des images de microtubules prises avec les faisceaux classiques en  $A/$  (avec  $g = 0.8$ ) et Bessel-Gauss en  $B/$  (avec  $g = 1.0$ ). *Gauche* : images confocales (avec faisceaux gaussien et Bessel-Gauss). *Centre* : images SLAM et B-SLAM. *Droite* : profils normalisés pris le long des lignes de couleurs sur les images. Diamètre du sténopé :  $10 \mu\text{m}$ . Barre d'échelle :  $1 \mu\text{m}$ .

Le graphique à la fig. 1.17 représente l'évolution du ratio d'intensité sur une période de 10 minutes d'illumination continue. Les lignes pleines sont les courbes abtenues avec le faisceau gaussien TEM<sub>00</sub> et les lignes en pointillés celles compilées avec le faisceau Bessel-Gauss d'ordre 0. Chaque couleur représente une puissance équivalente entre les deux faisceaux. D'après ce graphique, on conclut que pour une puissance laser donnée, l'illumination avec le faisceau Bessel-Gauss résulte en un photoblanchiment moins important que l'illumination avec le faisceau gaussien. Cependant, pour obtenir une image de qualité identique (en terme de ratio signal à bruit : SNR), le faisceau Bessel-Gauss requiert plus de puissance que le faisceau gaussien. Ceci est dû à la perte de puissance dans les lobes secondaires du faisceau Bessel-Gauss ainsi qu'à sa profondeur de champ étendue.

Pour estimer le rapport signal à bruit nous avons filtré chaque image avec un filtre gaussien (largeur à mi-hauteur de 1 pixel) et comparé l'image filtrée avec l'image originale. Nous avons considéré la différence entre les deux images comme étant le bruit. Nous avons ensuite utilisé

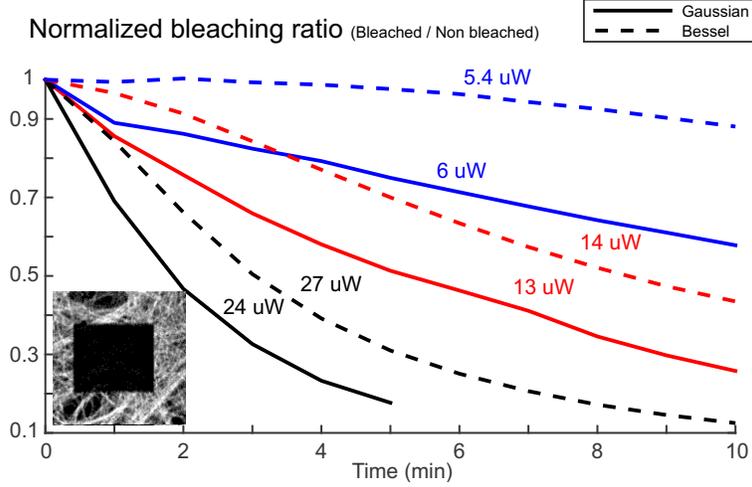


FIGURE 1.17 – Ratio d’intensité normalisé mesurant le photoblanchiment avec le faisceau gaussien  $TEM_{00}$  (lignes pleines) et le faisceau Bessel-Gauss d’ordre 0 (lignes pointillées) pour trois différentes puissances d’entrée mesurées à l’objectif. L’image encadrée montre un exemple du champ observé pour les mesures de photoblanchiment. La zone noire est la zone qui a été illuminée pendant 10 minutes (qui est complètement photoblanchie dans ce cas) et le pourtour est utilisé comme référence (puisque’il n’a reçu aucune illumination durant ces 10 minutes). Taille de l’image encadrée :  $250 \mu\text{m} * 250 \mu\text{m}$ .

la définition du rapport signal à bruit donnée en [199] qui est :

$$\text{SNR}_{\text{rms}} = \left( \frac{\sum_{x=0}^{M-1} \sum_{y=0}^{N-1} \hat{f}(x, y)^2}{\sum_{x=0}^{M-1} \sum_{y=0}^{N-1} [\hat{f}(x, y) - f(x, y)]^2} \right)^{\frac{1}{2}} \quad (1.11)$$

$$\text{SNR}_{\text{rms dB}} = 10 \log_{10} (\text{SNR}_{\text{rms}}) \quad (1.12)$$

où  $\text{SNR}_{\text{rms}}$  désigne le rapport signal à bruit de moyenne quadratique pondérée (*root mean square SNR*),  $M$  et  $N$  sont les dimensions de l’image bruitée  $\hat{f}(x, y)$ . Dans notre cas, l’image réelle  $f(x, y)$  est impossible à obtenir. Nous avons donc considéré l’image filtrée comme une bonne estimation et l’avons utilisée à la place.  $x$  et  $y$  représentent les indices selon les deux dimensions de l’image.

Les acquisitions avec une puissance de  $6 \mu\text{W}$  pour le faisceau gaussien ont un  $\text{SNR}_{\text{rms}}$  de 8 dB, ce qui est comparable aux acquisitions ayant une puissance de  $14 \mu\text{W}$  pour le faisceau Bessel-Gauss qui ont un  $\text{SNR}_{\text{rms}}$  de 7.3 dB. La différence en  $\text{SNR}_{\text{rms}}$  est de 0.7 dB, ce qui veut dire que l’image Bessel-Gauss prise avec une puissance de  $14 \mu\text{W}$  est  $\approx 17\%$  plus bruitée que l’image gaussienne prise avec une puissance de  $6 \mu\text{W}$ . En conclusion, si nous réglons la puissance laser pour le faisceau Bessel-Gauss de manière à ce que l’effet de photo-blanchiment soit identique à celui obtenu avec le faisceau gaussien, nous aurons une image  $\approx 17\%$  plus bruitée.

## 1.7 Discussion

Dans cette étude nous avons pu prendre avantage du fait que la tache de diffraction d'un faisceau Bessel-Gauss demeure plus petite que celle d'un faisceau gaussien pour augmenter la résolution en microscopie confocale. Il est aussi avantageux d'utiliser les faisceaux Bessel-Gauss car leur largeur est constante sur la totalité de la profondeur de champ alors que les faisceaux gaussiens divergent en cône même sur  $1 \mu\text{m}$  de profondeur de champ donné par un sténopé avec  $1 \text{ AU}$  de diamètre. De plus, les faisceaux Bessel-Gauss sont naturellement plus résistants à la diffusion grâce à leur propriété d'auto-reconstruction ; ils peuvent donc être utilisés pour faire de l'imagerie plus profonde que la microscopie confocale à faisceau gaussien. Les effets d'un sténopé de faible diamètre ont été étudiés sur des faisceaux Laguerre-Gauss d'ordre élevé de polarisation radiale dans [184] mais les essais expérimentaux précédents montraient des résidus de lobes secondaires [182,183] dégradant l'image. Une fente horizontale a également été utilisée pour éliminer la fluorescence de fond en imagerie par feuille de lumière [200]. En utilisant les faisceaux Bessel-Gauss en microscopie confocale avec un sténopé suffisamment petit, nous avons pu mesurer une amélioration de la résolution de  $\approx 20\%$  sur différents types d'échantillons, confirmant ainsi l'efficacité des faisceaux Bessel-Gauss comme une alternative aux faisceaux gaussiens en microscopie confocale. L'utilisation des faisceaux Bessel-Gauss pour l'étude de colocalisation donne une amélioration au-delà de l'augmentation linéaire de la résolution.

Notre méthode a l'avantage de pouvoir être utilisée pour créer des faisceaux Bessel-Gauss d'ordres différents. Cette propriété nous a permis d'augmenter la résolution de la microscopie SLAM jusqu'à  $\approx 105 \text{ nm}$ . La microscopie SLAM n'est pas limitée aux modalités de fluorescence mais peut être utilisée avec tous les types de microscopie à balayage laser. Il en est de même pour l'utilisation des faisceaux Bessel-Gauss. Une équipe a récemment utilisé les faisceaux Bessel-Gauss en microscopie CARS (Coherent Anti-stokes Raman Scattering) pour en augmenter la résolution [201] ; puisque les microscopies CARS et deux photons sont compatibles avec la méthode SLAM ([107,109]), l'utilisation de faisceaux Bessel-Gauss permettrait d'améliorer la résolution de ces modalités.

Le facteur d'augmentation de la résolution mesuré est de  $\approx 1.3$  pour la microscopie confocale à faisceaux Bessel-Gauss et de  $\approx 2.5$  pour la microscopie B-SLAM, en comparaison avec la résolution théorique de la microscopie confocale classique (à faisceaux gaussiens). La méthode proposée ne permet pas d'obtenir des résolutions comparables aux microscopies STED (STimulated Emission Depletion [38]), STORM (STochastic Optical Reconstruction Microscopy [96]) ou PALM (Photo Activated Localization Microscopy [97]) ; cependant son design est suffisamment simple pour pouvoir être intégré dans un microscope commercial. La microscopie STED nécessite des lasers pulsés de haute puissance, ce qui rend le système de microscopie plus complexe qu'un système de microscopie confocale. Les microscopies STORM et PALM sont incompatibles avec l'imagerie dans des tissus profonds et sont lentes car une multitude d'images est nécessaire. De plus, la méthode proposée ici dépend uniquement du changement

de faisceaux laser ; elle ne nécessite pas de marquage fluorescent spécifique comme pour les microscopies du type STED, STORM et PALM. La plus grande limitation de la méthode SLAM (la création de valeurs négatives après la soustraction) est mentionnée dans [202] et une tentative de correction y est proposée.

À cause de la présence de lobes secondaires dans les faisceaux Bessel-Gauss, une partie de la puissance est perdue. Pour garder la même qualité d'image (rapport signal à bruit) qu'avec les faisceaux gaussiens, la puissance laser doit être augmentée pour générer une densité d'énergie similaire dans le lobe central. Cependant, les pertes de puissance liées aux lobes secondaires et à l'élongation du faisceau ne sont pas suffisamment importantes pour nécessiter des lasers de haute puissance. Les acquisitions faites avec les faisceaux gaussiens nécessitent entre 2 et 20  $\mu\text{W}$  selon l'échantillon ; les observations correspondantes faites avec les faisceaux Bessel-Gauss nécessitent entre 5 et 50  $\mu\text{W}$ . Toutes les mesures de puissance ont été prises à l'entrée de l'objectif. Une autre solution au problème lié aux lobes secondaires serait d'utiliser l'effet deux photons. Dans ce cas, l'excitation des lobes secondaires est grandement réduite et l'image est obtenue avec une profondeur de champ augmentée [174, 176] (dans le cas où aucun sténopé est utilisé).

Un aspect important de l'intégration expérimentale des faisceaux Bessel-Gauss est l'utilisation d'un iris juste avant l'axicon pour ajuster la largeur du faisceau d'entrée. Cette largeur a une incidence sur la profondeur de champ du faisceau Bessel-Gauss. Réduire la largeur de ce faisceau incident réduit la profondeur de champ du faisceau Bessel-Gauss sans affecter sa largeur, et donc sans en affecter la résolution (jusqu'à une certaine limite, où le faisceau redevient gaussien). Il est donc bon de réduire au minimum cette largeur incidente, soit avec une paire de lentilles, soit avec un iris. De plus, la réduction au minimum de la profondeur de champ réduirait l'illumination de l'échantillon, ce qui limiterait le photoblanchiment.

La méthode proposée permet l'augmentation de la résolution de la microscopie confocale de  $\approx 20\%$  en ajoutant seulement quelques éléments optiques sur le chemin optique. Cette méthode utilise uniquement un changement de faisceaux laser et ne dépend donc pas des propriétés de fluorophores spécifiques ni ne nécessite plusieurs acquisitions (excepté pour B-SLAM qui ne nécessite seulement que deux images). La méthode utilisée est suffisamment flexible pour nous permettre de créer des faisceaux Bessel-Gauss d'ordre 1 avec un faisceau incident de polarisation azimutale. De plus, la conception utilisée ici avec l'axicon peut être adaptée sur un système commercial de microscopie confocale / deux photons [175].

## Chapitre 2

# Augmentation de résolution par déconvolution à l'aide de modes laser structurés : D-SLAM

Notre objectif est d'utiliser différents modes laser, ayant des contenus fréquentiels différents, pour aider le processus de déconvolution. Une PSF ayant un contenu élevé de haute fréquences apportera plus d'informations à la déconvolution pour retrouver le contenu en hautes fréquences de l'image qu'une PSF avec un contenu en hautes fréquences plus faible. De plus, en utilisant deux différentes PSF provenant de l'utilisation de deux modes laser différents et ayant des contenus fréquentiels complémentaires, il est possible de faciliter la déconvolution. Les deux modes laser que nous utiliserons sont les modes lasers utilisés pour la méthode SLAM.

### 2.1 Impact de la PSF sur le procédé de déconvolution

Dans cette section, nous allons montrer, en utilisant un simple filtre déconvolutif, qu'une MTF (Modulation Transfer Function, qui est la transformée de Fourier de la PSF) avec un contenu fréquentiel élevé aide à retrouver plus de contenu en hautes fréquences dans l'image. Nous proposons d'utiliser le mode laser  $TE_{01}$  en forme de beigne, qui a une MTF ayant un contenu fréquentiel plus élevé que celle du mode fondamental  $TEM_{00}$ . Cependant, la MTF du mode  $TE_{01}$  manque de contenu en moyenne fréquences. Nous garderons donc le mode  $TEM_{00}$  et utiliserons les deux images prises avec les deux modes laser, et donc les deux MTF, pour la déconvolution.

La fig. 2.1 montre les deux MTF des faisceaux gaussien  $TEM_{00}$  polarisé verticalement (en *A*) et  $TE_{01}$  polarisé azimutalement (en *B*) ainsi que la superposition des deux (en *C*) pour faciliter la comparaison. Nous pouvons facilement voir d'après ces images que la MTF du faisceau  $TE_{01}$  a un contenu fréquentiel plus élevé que celle du faisceau  $TEM_{00}$ . Ce que nous

montrons ici est l'impact du contenu fréquentiel d'une MTF sur le résultat de la déconvolution. Une MTF ayant un contenu fréquentiel plus élevé, permettra de retrouver plus de hautes fréquences normalement dominées par le bruit dans l'image et permettrait ainsi d'obtenir ainsi une meilleure résolution. On remarque cependant un manque de fréquences moyennes dans la MTF du faisceau  $TE_{01}$  ; c'est pourquoi nous proposons d'utiliser dans la déconvolution deux images prises avec les deux MTF présentées ( $TEM_{00}$  et  $TE_{01}$ ) en même temps.

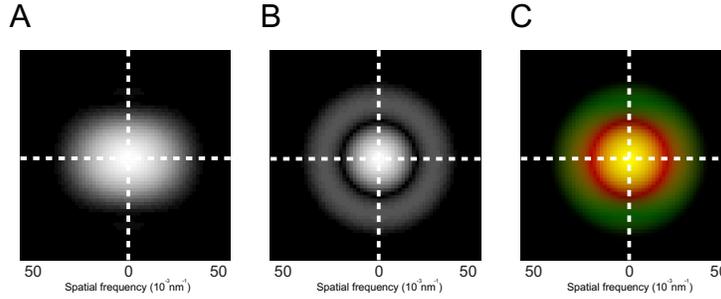


FIGURE 2.1 – Modules des MTF pour les faisceaux  $TEM_{00}$  en *A/* et  $TE_{01}$  en *B/* ainsi que la superposition des deux en *C/*. En *C/* la MTF du faisceau  $TEM_{00}$  est en *rouge* et la MTF du faisceau  $TE_{01}$  est en *vert*. Le centre de chaque image correspond à la fréquence spatiale nulle et la fréquence augmente radialement.

La fig. 2.2 montre les deux images simulées, utilisées pour démontrer les bases de la méthode. Les deux PSF utilisées sont celle présentées à la fig. 0.23 et leur MTF correspondantes sont présentées à la fig. 2.1. Pour la simulation, nous avons placé quatre séries de quatre objets ponctuels, disposés en rectangle sur l'image. L'espacement vertical entre les points est de 20 pixels (200 nm) sur la première ligne et de 30 pixels (300 nm) sur la deuxième ligne. L'espacement horizontal entre les points est de 20 pixels (200 nm) sur la première colonne et de 30 pixels (300 nm) sur la deuxième colonne. Chaque image est ensuite convoluée avec la PSF correspondante (des modes  $TEM_{00}$  ou  $TE_{01}$ ). Du bruit est ajouté aux images après convolution pour simuler une situation plus réaliste.

### 2.1.1 Pré-étude avec le filtre de Wiener

Nous allons maintenant tester l'effet de ces deux MTF aux contenus différents avec un filtre déconvolutif simple : le filtre de Wiener [203]. Le filtre de Wiener (éq. (2.1)) est un filtre linéaire minimisant l'erreur quadratique de la reconstruction. L'image filtrée est obtenue en multipliant le filtre de Wiener, exprimé dans l'espace de Fourier, par la transformée de Fourier de l'image ( $\hat{y}_u$ ) :  $\hat{x}_u^{\text{Wiener}} = \hat{f}_u^{\text{Wiener}} \cdot \hat{y}_u$  puis en prenant la transformée de Fourier inverse du résultat  $\hat{x}_u^{\text{Wiener}}$ . L'accent circonflexe  $\hat{\cdot}$  est utilisé pour représenter la transformée de Fourier du terme sur lequel il est placé ( $\hat{f}$  représente la transformée de Fourier de  $f$ ).

$$f^{\text{Wiener}} = \underset{f^{\text{Wiener}}}{\operatorname{argmin}} E\{\|x^{\text{Wiener}} - x^{\text{True}}\|^2\}, \quad (2.1)$$

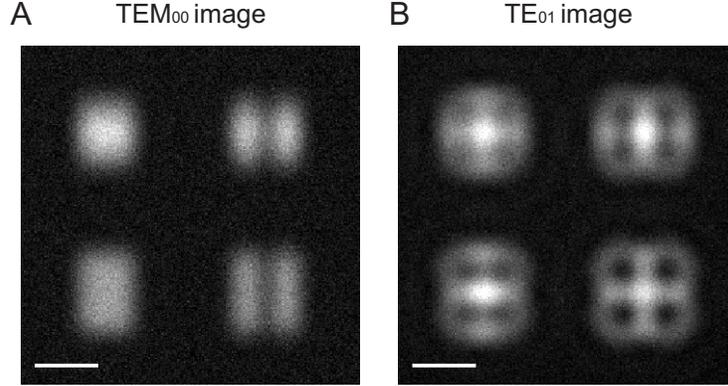


FIGURE 2.2 – Images confocales simulées obtenues par convolution entre des objets ponctuels (d’une taille de 1 pixel) et la PSF correspondante. *A/* Image obtenue avec le faisceau gaussien polarisé verticalement  $TEM_{00}$ . *B/* Image obtenue avec le faisceau  $TE_{01}$  polarisé azimuthalement. Taille du pixel pour la simulation : 10 nm. Barre d’échelle : 500 nm.

$$f^{Wiener} = \underset{f^{Wiener}}{\operatorname{argmin}} E\{||\hat{f}_u^{Wiener} \cdot \hat{y}_u - x^{True}||^2\}, \quad (2.2)$$

avec  $E\{\}$  l’espérance mathématique,  $x^{True}$  l’objet réel (image parfaite) et  $x^{Wiener}$  l’image filtrée par le filtre de Wiener. Le terme  $||x^{Wiener} - x^{True}||^2$  définit l’erreur quadratique que le filtre minimise. La notation

$$\underset{f}{\operatorname{argmin}} \varphi(f) \quad (2.3)$$

est une notation standard qui désigne l’élément  $f$  qui minimise l’expression  $\varphi(f)$ .

Pour un bruit centré et non corrélé et en considérant que les images naturelles suivent une loi de puissance ( $\alpha||u||^\beta$ ), l’expression du filtre dans l’espace de Fourier est ([204]) :

$$\hat{f}_u^{Wiener} = \frac{\hat{h}_u^*}{|\hat{h}_u|^2 + \alpha||u||^\beta}; \quad (2.4)$$

$\hat{h}$  est la MTF de l’acquisition (image) correspondante (mode  $TEM_{00}$  ou  $TE_{01}$ ),  $u$  la composante fréquentielle,  $\alpha$  et  $\beta$  des paramètres. Dans nos tests,  $\beta$  est mis à 2 pour avoir une loi quadratique, qui correspond au type de loi qui représente au mieux les images naturelles.  $\alpha$  est ajusté manuellement pour obtenir l’image la plus juste possible.

Les fig. 2.3-*A* et 2.3-*B* montrent les résultats de la déconvolution par filtre de Wiener sur deux images acquises avec deux PSF différentes : celle du mode  $TEM_{00}$  en *A* et celle du mode  $TE_{01}$  en *B*. En comparant les images, à la fig. 2.3-*A* et 2.3-*B*, on observe que l’image ayant été prise avec le faisceau  $TE_{01}$  produit un résultat de meilleure résolution que celle prise avec le faisceau  $TEM_{00}$ . Les effets d’anneaux autour des structures sont dus à des artefacts que le filtre de Wiener est connu pour créer. Ils sont cependant plus importants dans l’image prise avec les faisceaux  $TE_{01}$  car sa MTF manque de contenu en moyennes fréquences par rapport à la MTF

du faisceau  $\text{TEM}_{00}$ . C'est pour réduire cet artéfact d'anneaux que nous suggérons d'utiliser les deux images et MTF simultanément pour la déconvolution. Cependant cette combinaison ne peut être faite simplement avec le filtre de Wiener ; nous utiliserons une autre méthode plus adaptée en section 2.2.3 pour démontrer cet effet.

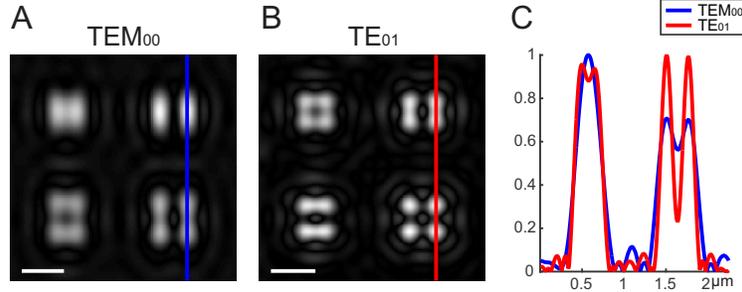


FIGURE 2.3 – Résultats de la déconvolution par filtre de Wiener sur l'image prise avec le mode  $\text{TEM}_{00}$  en *A*/ et le mode  $\text{TE}_{01}$  en *B*/. En *C*/ sont représentés les profils pris le long des lignes de couleur sur les images en *A* (tracée en *bleu*) et *B* (tracée en *rouge*). Barre d'échelle : 500 nm

La fig. 2.4-*A* montre en *vert* les composantes fréquentielles de l'image filtrée acquise avec le mode  $\text{TEM}_{00}$ . Les composantes fréquentielles présentes uniquement dans l'image filtrée acquise avec le mode  $\text{TE}_{01}$  sont en *rouge* (elle ne sont pas présentes dans l'image filtrée acquise avec le mode  $\text{TEM}_{00}$ ). Ces composantes sont des composantes de plus haute fréquence que celles en *vert* ; elles contiennent donc plus d'informations de haute résolution. La fig. 2.4-*B* montre les composantes fréquentielles totales des deux images filtrées, celles du mode  $\text{TEM}_{00}$  en *vert* et celle du mode  $\text{TE}_{01}$  en *rouge*. La superposition des deux en *B* montre une bande purement verte dans les moyennes fréquences ; cela justifie notre objectif d'utiliser les deux images.

Pour conclure, dans cette section nous avons démontré qu'en faisant varier la forme du faisceau laser dans le microscope à balayage laser, nous pouvons aider un algorithme de déconvolution à retrouver plus de contenu de hautes fréquences. Nous obtenons ainsi une image déconvoluée avec une meilleure résolution qu'en déconvoluant simplement l'image prise avec le faisceau classique. Dans la section suivante, nous démontrons plus amplement cet effet en utilisant un algorithme de déconvolution itératif permettant de pallier le problème des artéfacts dus au filtre de Wiener.

## 2.2 Solution Maximum a posteriori (MAP)

Nous choisissons ici d'utiliser une méthode de déconvolution basée sur l'expression du Maximum a posteriori car sa généralisation aux cas multi-images et multi-PSF a déjà été démontrée et est simple à mettre en œuvre [122]. La méthode utilisée ici est dérivée de la solution au sens du maximum de vraisemblance ([120]). La solution maximum de vraisemblance (ML : maximum likelihood) est obtenue en maximisant le terme de vraisemblance des données. Cette

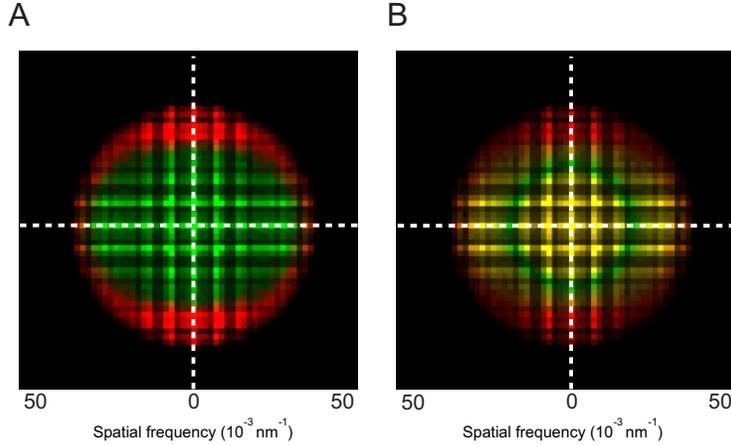


FIGURE 2.4 – *A/* En *rouge* sont affichées les composantes fréquentielles présentes dans l’image filtrée prise avec le mode  $TE_{01}$  et non présentes dans l’image filtrée prise avec le mode  $TEM_{00}$ , représentées en *vert*. *B/* Contenu fréquentiel total (module des MTF) des deux images filtrées prises par le mode  $TE_{01}$  en *rouge* et le mode  $TEM_{00}$  en *vert*. Le *jaune* représente la superposition des deux couleurs.

solution a besoin d’être ensuite modifiée pour pouvoir prendre en compte le bruit dans le signal (image) : un terme de régularisation (aussi appelé a priori) est ajouté au terme de vraisemblance. En ajoutant ce terme de régularisation et en considérant les variables comme des densités de probabilité, on a changé la solution en une solution dite du maximum a posteriori. Les densités de probabilité sont considérées comme suivant des fluctuations gaussiennes. Nous présentons ici une application de cette méthode au problème de déconvolution. Pour une démonstration plus complète et détaillée de la méthode se référer à [120] et [205].

Dans notre étude nous avons considéré les PSF comme invariantes dans notre champ de vue et nous avons restreint les images à des images en deux dimensions (le sténopé du microscope confocal nous donne un bon sectionnement optique et donc une profondeur de champ très faible).

En suivant cette méthodologie nous trouvons que la solution de la déconvolution est l’image optimale  $x$  qui minimise la fonction-coût suivante :

$$\phi_{\text{MAP}}(x) = \phi_{\text{ML}}(x) + \phi_{\text{prio}}(x), \quad (2.5)$$

avec

$$\phi_{\text{ML}}(x) = (H \cdot x - y)^T \cdot W \cdot (H \cdot x - y) \quad (2.6)$$

étant la solution au sens du maximum de vraisemblance,  $H$  l’opérateur de convolution par la PSF,  $x$  la solution (image déconvoluée) et  $y$  l’image observée.  $T$  est l’opérateur de transposition et  $W$  une matrice de poids représentant l’inverse de la matrice de covariance du bruit. Cette matrice est aussi appelée matrice de variance-covariance. Ses éléments diagonaux sont les variances et les éléments  $(i,j)$  sont les covariances entre les positions  $i$  et  $j$ . En considérant

un bruit gaussien non corrélé, cette matrice devient diagonale (seulement les variances sont calculées). Cette matrice est aussi utilisée pour inclure d'autres types d'information sur l'image mesurée, comme un pixel mort sur un détecteur qui sera représenté par un bruit de variance infinie et donc un zéro dans la matrice  $W$ . Dans notre étude nous l'avons utilisée pour prendre en compte les bords de l'image proprement, en faisant décroître les valeurs de  $W$  jusqu'à 0 lorsque l'on se trouve proche des bords de l'image (sur 10 à 20 pixels).

Cette méthode nous laisse une grande liberté quant au choix du terme de régularisation  $\phi_{\text{prio}}(x)$ . Ce terme de régularisation est utilisé pour introduire différentes sortes de connaissances « a priori » pour aider la déconvolution. De manière générale les termes d'« a priori » sont utilisés pour contrer l'amplification du bruit due à la déconvolution ainsi que pour imposer des contraintes comme la positivité au résultat. Nous allons maintenant présenter deux de ces termes de régularisation qui sont dédiés à contrer l'amplification du bruit.

### 2.2.1 Régularisation Tikhonov (régularisation quadratique)

La régularisation Tikhonov [206] est une régularisation classique de lissage qui permet une déconvolution rapide et est écrite pour les images en deux dimensions :

$$\phi_{\text{prio}}(x) = \mu \|D \cdot x\|, \quad (2.7)$$

$$\phi_{\text{prio}}(x) = \mu \sum_{i,j} [x_{i+1,j} - x_{i,j}]^2 + \mu \sum_{i,j} [x_{i,j+1} - x_{i,j}]^2, \quad (2.8)$$

où  $D$  est l'opérateur des différences finies,  $i$  et  $j$  sont les indices des pixels et  $\mu$  le paramètre de régularisation. Ce paramètre permet de donner un poids au lissage effectué par la régularisation et détermine ainsi la force du lissage appliqué à l'image pour contrer l'amplification du bruit. Si ce paramètre est trop élevé, le lissage empêche une déconvolution correcte et s'il est trop bas, des artéfacts dus à l'amplification du bruit apparaissent.

Pour trouver l'unique  $x$  minimum de cette fonction quadratique, pour une valeur de  $\mu$  donnée, il suffit de résoudre :

$$\Delta \phi_{\text{MAP}}(x) = 0 \quad (2.9)$$

$$H^T \cdot W \cdot H \cdot x + \mu D^T \cdot D \cdot x = H^T \cdot W \cdot y \quad (2.10)$$

A cause de la matrice de poids  $W$ , il n'y a pas de solution analytique. L'utilisation d'un algorithme d'optimisation itératif est nécessaire pour trouver le minimum. Nous avons choisi d'utiliser l'algorithme des gradients conjugués qui permet de résoudre les équations du type  $A \cdot x = b$ , où  $x$  est l'inconnue. Pour plus de détails sur les gradients conjugués voir [207]. Dans notre cas nous avons  $A = H^T \cdot W \cdot H + \mu D^T \cdot D$  et  $b = H^T \cdot W \cdot y$ .

Les régularisations quadratiques, telles que la régularisation Tikhonov, sont facilement différentiables mais ne sont pas très robustes face aux images très bruitées. De plus, elles ont

tendance à sur-lisser les images contenant des changements abrupts d'intensité (de manière très similaire au filtre de Wiener).

### 2.2.2 Régularisation à préservation de bords (régularisation non-quadratique)

Les régularisations à préservation de bords sont des régularisations qui sont plus robustes face au bruit et qui permettent, comme leur nom l'indique, de mieux conserver les changements abrupts d'intensité. Les plus utilisées sont les régularisations du type L2-L1 (quadratique-linéaire). Ces dernières se comportent comme des régularisations quadratiques pour les basses fréquences de l'image et changent de comportement pour adopter un profil linéaire en hautes fréquences. C'est ce comportement spécifique qui permet de lisser correctement le bruit tout en gardant un maximum d'informations de hautes fréquences et en minimisant les artéfacts de reconstruction.

La régularisation que nous avons choisie est présentée dans [118] et [122] :

$$\phi_{\text{prio}}(x) = \lambda_0 \sum_r \left[ \frac{\|\nabla \hat{x}(r)\|}{\theta_r} - \ln \left( 1 + \frac{\|\nabla \hat{x}(r)\|}{\theta_r} \right) \right], \quad (2.11)$$

avec  $\|\nabla \hat{x}(r)\|$  le gradient spatial de l'objet ( $x$ ) et  $\theta_r$  le paramètre qui détermine le point de changement entre le comportement quadratique et le comportement linéaire de la régularisation. La valeur de  $\theta_r$  peut être spécifique pour chaque pixel (comme expliqué dans [122]); cependant nous utiliserons ici une seule valeur pour  $\theta_r$  sur la totalité de l'image (comme dans [118]).  $\lambda_0$  est le paramètre de poids de la régularisation; il a le même rôle que le paramètre  $\mu$  de la régularisation Tikhonov.

A cause de la non quadraticité de la régularisation, nous ne pouvons plus utiliser la méthode des gradients conjugués directement. Nous utilisons une version modifiée des gradients conjugués, compatible avec les problèmes non linéaires pour correctement minimiser  $\phi_{\text{MAP}}(x)$ . Nous avons ajouté une autre modification à l'algorithme pour prendre en compte des contraintes limites. Pour cela nous avons utilisé la technique présentée en [208] dite de projection de gradient (« gradient projections » ou encore « active set of parameters ») pour forcer la positivité du résultat. Les images de microscopie étant prises avec des caméras ou détecteurs/compteurs de photons, les valeurs négatives n'ont ici aucun sens; il est donc approprié de forcer la positivité du résultat.

### 2.2.3 Termes de régularisation et application au cas multi images-PSF

Nous avons utilisé une version multi-images de l'algorithme de déconvolution en ajoutant un terme de vraisemblance par image (comme dans [122]). Nous utiliserons deux images du même champ prises avec deux PSF différentes pour obtenir l'image déconvoluée. La fonction-coût à

minimiser est donc :

$$\phi_{\text{MAP}}(x) = \phi_{\text{ML}_1}(x) + \phi_{\text{ML}_2}(x) + \phi_{\text{prio}}(x), \quad (2.12)$$

avec

$$\phi_{\text{ML}_1}(x) = (H_1 \cdot x - y_1)^T \cdot W \cdot (H_1 \cdot x - y_1), \quad (2.13)$$

$$\phi_{\text{ML}_2}(x) = (H_2 \cdot x - y_2)^T \cdot W \cdot (H_2 \cdot x - y_2), \quad (2.14)$$

et où  $H_1$  et  $H_2$  sont les deux opérateurs de convolution par les PSF respectives,  $y_1$  et  $y_2$  sont les deux images et  $\phi_{\text{prio}}(x)$  est le terme de régularisation (quadratique ou à préservation des bords).

La technique d'optimisation (minimisation de la fonction-coût) utilisée est la même que précédemment, gradient conjugué linéaire ou non linéaire selon la régularisation utilisée (quadratique ou à préservation des bords).

## 2.3 Caractérisation de l'algorithme et simulations

Le but de cette section est de caractériser les effets des deux régularisations de cet algorithme et de comparer les déconvolutions à une et deux images. Les PSF choisies sont celles utilisées pour la technique SLAM présentées à la fig. 0.23.

### 2.3.1 Présentation des données et PSFs

#### PSF simulées :

Pour la déconvolution à deux images nous utilisons les deux PSF de la technique SLAM : le faisceau gaussien polarisé linéairement  $\text{TEM}_{00}$  et le faisceau Laguerre-Gauss de polarisation azimutale  $\text{TE}_{01}$ . Pour la déconvolution à une image, seul le faisceau  $\text{TEM}_{00}$  est utilisé. Sur toute les simulations la taille du pixel est de 10 nm. Nous avons utilisé la méthode vectorielle de la diffraction de Richards-Wolf pour calculer les faisceaux laser au point focal telle que présenté à la section 1.2.1 (méthode dérivée de [185, 189]), et obtenir ainsi les PSF du microscope confocal.

#### Données simulées :

Pour cette série de simulations, nous avons placé quatre objets ponctuels disposés en carré sur une image. L'espacement vertical et horizontal entre les points est de 300 nm. Cette image est ensuite convoluée avec les PSF correspondantes.

Après normalisation de ces données simulées (entre 0 et 1) nous avons ajouté du bruit (en utilisant la fonction « imnoise » de Matlab). Pour être le plus proche possible de la réalité des images prises en microscopie optique, le bruit ajouté est un composite de bruit gaussien et de

Poisson. Les paramètres de chacun des bruits ont été sélectionnés pour mimer au plus proche le bruit observé sur le microscope confocal. Le bruit gaussien a une variance de  $\approx 0.01$  et une moyenne de  $\approx 0.05$ . Le bruit de Poisson a été ajouté après une mise à l'échelle d'un facteur environ 50 pour obtenir un bruit le plus proche possible des image expérimentales utilisées pour la calibration. Cela correspond à un bruit ayant une amplitude de  $\approx 0.05$  et une variance de  $\approx 0.0001$  dans les zones de faible intensité et une amplitude de  $\approx 0.4$  et une variance de  $\approx 0.004$  dans les zone de forte intensité sur des images normalisées à 1. Les paramètres de chaque type de bruit ont été sélectionnés pour correspondre au mieux au bruit des images en microscopie confocale et ont été comparés à une série d'images confocales de référence prises sur le microscope confocal utilisé. Le bruit mesuré a une moyenne de  $\approx 0.03$  et une variance de  $\approx 0.001$  dans les zones de faible intensité. Dans les zones de haute intensité le bruit mesuré a une moyenne de  $\approx 0.4$  et une variance de  $\approx 0.03$ .

### 2.3.2 Comparaison des méthodes sur données simulées

Les fig. 2.5 et 2.6 montrent plusieurs résultats de déconvolution et les comparent avec les images confocales et SLAM. Les profils à la fig. 2.6 sont pris selon les lignes rouges tracées à la fig. 2.5.

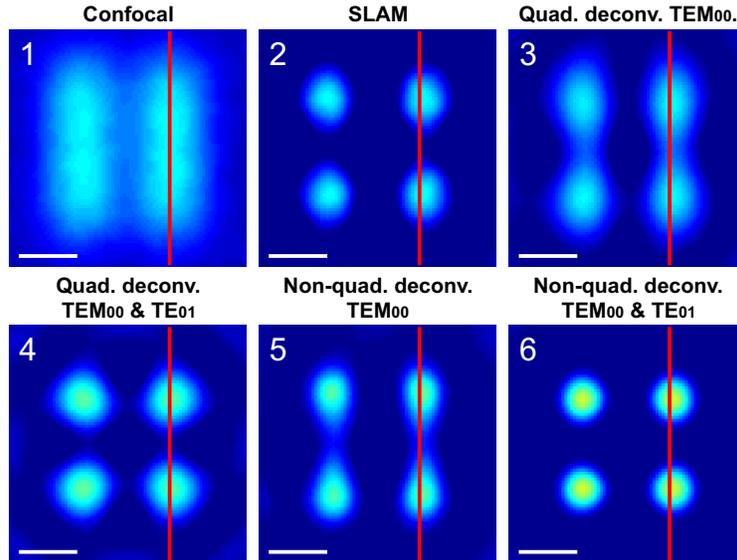


FIGURE 2.5 – Résultats de déconvolution (3-6) comparés aux images confocales (1) et SLAM (2) sur les données simulées représentant quatre points séparés par 30 pixels (300 nm). Les quatre points de l'image originale sont trop petits pour être visibles sur une image (chaque point ne fait qu'un pixel). Quad. deconv. est l'abréviation pour la déconvolution avec la régularisation quadratique (Tikhonov). Non-quad. deconv. est l'abréviation pour la déconvolution avec la régularisation non quadratique (L2-L1 à préservation de bords). La PSF du faisceau gaussien polarisé verticalement est abrégée par TEM<sub>00</sub> et celle pour le faisceau Laguerre-Gauss polarisé azimuthalement est TE<sub>01</sub>. TEM<sub>00</sub>&TE<sub>01</sub> est utilisé pour spécifier que la méthode de déconvolution avec les deux couples image-PSF est choisie (4 et 6). Barre d'échelle : 200 nm.

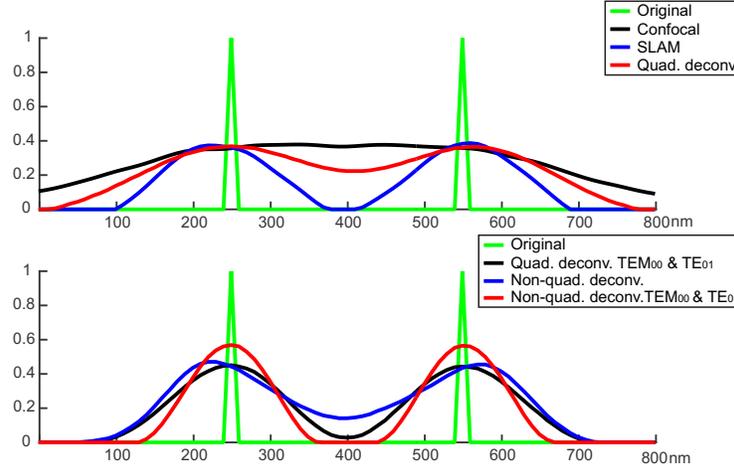


FIGURE 2.6 – Les profils correspondent aux lignes rouges tracées sur la fig. 2.5. Les points simulés sont représentés en *vert*.

Comme montré par les fig. 2.5 et 2.6, l'utilisation de deux PSF ayant des contenus fréquentiels différents ( $TEM_{00}$  et  $TE_{01}$ ) permet d'augmenter la qualité de la déconvolution et de réduire la largeur à mi-hauteur (FWHM) résiduelle des objets ponctuels.

Les figures 2.5 et 2.6 montrent également l'importance dans le choix de la régularisation pour les algorithmes de déconvolution. En effet, la régularisation L2-L1 à préservation de bords donne une meilleure reconstruction que la régularisation Tikhonov (comparer les images 3 et 5 à la fig. 2.5). Ceci reste vrai dans le cas de la déconvolution à deux couples image-PSF (comparer les images 4 et 6 à la fig. 2.5). D'après les profils à la fig. 2.6, nous constatons que la méthode SLAM, ainsi que la déconvolution à une image, tendent à retrouver des maxima légèrement décalés par rapport à l'original. Cet effet est corrigé lorsque la déconvolution à deux images est utilisée.

### Largeur à mi-hauteur résiduelle

Pour caractériser le gain en résolution des différentes méthodes, nous avons mesuré les largeurs à mi-hauteur des PSF résiduelles sur les objets ponctuels de chaque image (Table 2.1).  $\pm X$  représente les incertitudes de mesures liées à la taille du pixel.

## 2.4 Applications expérimentales

Dans cette section, nous présentons les résultats de déconvolution sur des acquisitions expérimentales effectuées sur un microscope confocal construit par nous-même, avec un objectif à eau d'ouverture numérique  $NA = 1.2$ . La longueur d'onde d'excitation est de 532 nm. Le microscope utilisé est celui présenté en section 1.2.2.

Méthodes	FWHM verticale (nm)	FWHM Horizontale (nm)
Confocal	310 ± 10	270 ± 10
SLAM	150 ± 10	120 ± 10
Quad. deconv. TEM <sub>00</sub>	270 ± 10	140 ± 10
Quad. deconv. TEM <sub>00</sub> et TE <sub>01</sub>	150 ± 10	150 ± 10
Non-quad. deconv. TEM <sub>00</sub>	160 ± 10	100 ± 10
Non-quad. deconv. TEM <sub>00</sub> et TE <sub>01</sub>	120 ± 10	110 ± 10

TABLE 2.1 – Largeur à mi-hauteur résiduelle de la PSF prise sur l’objet ponctuel pour chaque méthode testée dans les deux directions (verticale et horizontale). Mesures prises sur les données présentées à la fig. 2.5 et 2.6. Toute les mesures sont données pour une longueur d’onde de 532 nm.

### 2.4.1 Extraction des PSFs

Pour pouvoir effectuer une déconvolution correctement, il est nécessaire de connaître la PSF avec la meilleure précision possible. Dans le cas présent, la PSF est mesurée sur des échantillons de nano-sphères fluorescentes de 100 nm de diamètre. Une image des ces nano-sphères est prise avec un grossissement identique à l’image qui sera traitée. Un algorithme va ensuite détecter les nano-sphères uniques, à partir d’une référence, et les moyenner pour obtenir une mesure non bruitée la plus proche possible de la PSF réelle. L’algorithme 1 présente les étapes clés du traitement permettant d’extraire la PSF de l’image de nano-sphères.

---

**Algorithme 1** : Extraction de PSF à partir d’image de nano-sphères.

---

- 1 Extraction de PSF ( $I, \text{Ref}, p$ );  
**Input** : Image de nano-sphères I. PSF de référence Ref. Pourcentage de corrélation p  
**Output** : PSF<sub>exp</sub>
  - 2 Calculer une carte de corrélation 2D entre la PSF de référence Ref et l’image I;
  - 3 Binariser la carte de corrélation en fonction du pourcentage p choisi;
  - 4 Éliminer les doublons détectés, chaque point de corrélation représente une PSF détectée;
  - 5 Extraire des images de PSF de I en fonction des points de corrélation;
  - 6 Moyenner les images de PSF extraites de I.
- 

### 2.4.2 Application sur des échantillons de nano-sphères

Dans cette section, nous avons comparé l’efficacité de la déconvolution multi-images face à la méthode SLAM, en observant des échantillons de nano-sphères fluorescentes de 100 nm de diamètre. Ces nano-sphères ont un pic d’absorption à 560 nm et sont placées sur une lamelle de verre avant d’être fixées avec un milieu de montage d’indice de réfraction  $\approx 1.4$  (*Fluorescent mounting medium, Dako*). Les deux images sont prises successivement avec les deux faisceaux laser TEM<sub>00</sub> et TE<sub>01</sub> et ont nécessité un alignement numérique avant traitement (déconvolution ou SLAM). Le diamètre du sténopé est dans ce cas de  $50 \mu\text{m} \approx 4 \text{ AU}$ . Étant donné que les nano-sphères sont dans un plan unique, cela nous permet d’avoir un meilleur signal qu’avec un sténopé de 1 AU.

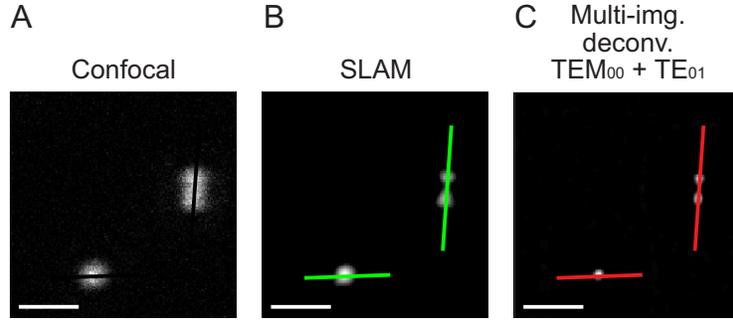


FIGURE 2.7 – Comparaison expérimentale sur un échantillon de nano-sphères. *A/* Image confocale classique. *B/* Image SLAM. *C/* : Résultat de la déconvolution multi-image ( $TE_{00}$  et  $TE_{01}$ ) avec régularisation L2-L1 à préservation de bords. Barre d'échelle : 1  $\mu\text{m}$ .

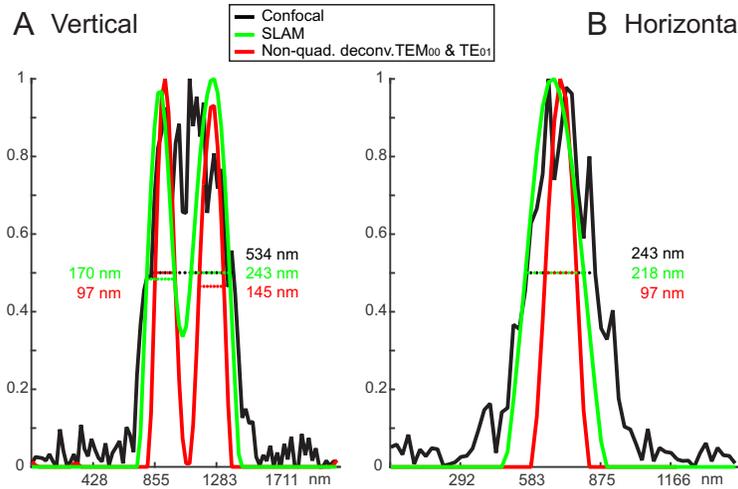


FIGURE 2.8 – Profils pris sur les images de la fig. 2.7. *A/* Profil vertical. *B/* Profil horizontal. *Noir* : image confocale classique. *Vert* : image SLAM. *Rouge* : résultat de la déconvolution multi-images ( $TE_{00}$  et  $TE_{01}$ ) avec régularisation L2-L1 à préservation de bords.

Nous constatons, d'après la fig. 2.7, que la déconvolution nous permet de résoudre deux nano-sphères qui sont normalement non résolues en imagerie confocale classique. En regardant les profils à la fig. 2.8, nous remarquons clairement l'amélioration apportée par la déconvolution. Le bruit a presque entièrement disparu et la résolution a été grandement augmentée par rapport à l'image initiale (cf fig. 2.8-*A*). En comparant les profils pris sur les images SLAM et déconvoluées, on a pu conclure que la déconvolution permet d'obtenir une meilleure résolution (cf fig. 2.8-*A*). Cela laisse une PSF résiduelle de largeur à mi-hauteur bien plus faible que la méthode SLAM (cf fig. 2.8-*B*). La largeur à mi-hauteur résiduelle de la méthode SLAM n'est pas aussi bonne que le prédit la théorie car il subsiste des imperfections et une légère asymétrie sur le faisceau  $TE_{01}$  expérimental. Pour que le SLAM puisse fonctionner correctement, le faisceau  $TE_{01}$  a besoin d'être parfaitement symétrique, ce qui n'est pas absolument nécessaire pour la déconvolution.

Une précision est cependant nécessaire : la mesure des PSF pour la déconvolution est effectuée en moyennant plusieurs nano-sphères sur une image. Le faisceau laser ayant une largeur à mi-hauteur d'environ 250 nm, une nano-sphère d'environ 100 nm n'augmente pas de manière significative la mesure de la PSF (la différence due à la taille de la nano-sphère est plus petite que la taille de notre pixel). Elle nous permet ainsi une bonne estimation de la PSF.

### 2.4.3 Application sur des échantillons biologiques

Dans cette section, nous changeons d'échantillon pour nous focaliser sur un marquage en fluorescence de microtubules. Les cellules utilisées sont des cellules de cultures de neurones d'hippocampe de rat, fixées dans une solution de PFA à 4%. Les microtubules sont ensuite marqués par immunohistochimie (anticorps primaire : monoclonal anti-acetylated -tubulin ; anticorps secondaire : donkey anti-mouse Rhodamine RedX). Les images sont ensuite prises sur le même microscope que précédemment (fig. 1.3) en utilisant l'objectif d'ouverture numérique  $NA = 1.2$  à immersion à eau. Le sténopé a un diamètre de  $10 \mu\text{m} \approx 1 \text{ AU}$ .

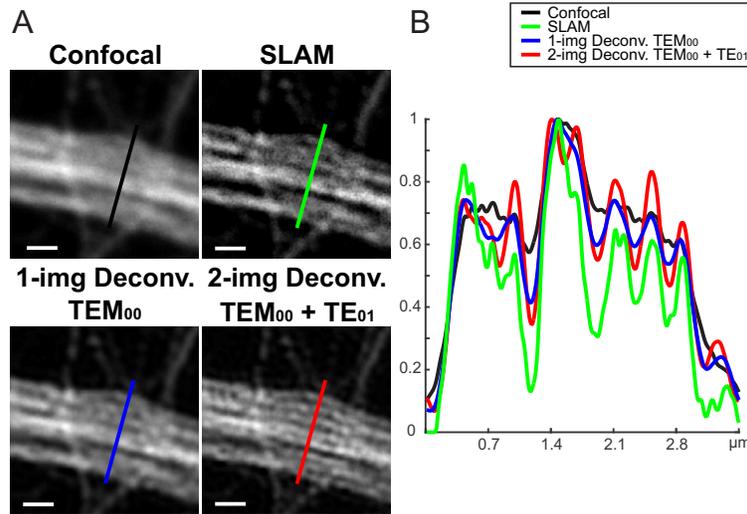


FIGURE 2.9 – *A/* Comparaison entre les images confocales, SLAM et déconvolution avec une ( $TEM_{00}$ ) ou deux images ( $TEM_{00}$  et  $TE_{01}$ ) utilisant la régularisation L2-L1 à préservation de bords. Barre d'échelle :  $1\mu\text{m}$ . *B/* Profils intégrés de 10 pixels de large sur les lignes présentes en *A/*. *Noir* : confocale. *Vert* : SLAM. *Bleu* : déconvolution avec une image. *Rouge* : déconvolution avec deux images.

La fig. 2.9 compare les améliorations obtenues avec la méthode SLAM et les déconvolutions à une ou deux images. L'image confocale a été filtrée avec un filtre gaussien de largeur à mi-hauteur de deux pixels pour éliminer le bruit et faciliter la comparaison. Chaque méthode présente clairement une amélioration de résolution et de contraste par rapport à l'image confocale. Les images sont présentées à la fig. 2.9-A. En regardant sur les profils à la fig. 2.9-B, on remarque clairement que la déconvolution à deux images ressort clairement car elle permet de

résoudre des structures qui ne sont pas résolues ou à peine visibles avec la déconvolution à une image ou la méthode SLAM.

Nous avons ensuite comparé l'amélioration de résolution sur un autre échantillon où la protéine Gephyrin a été immuno-détectée par un anticorps couplé avec le fluorophore mAb7a Oyster 550 ayant un pic d'excitation à 551 nm. Les images ont été prises sur le même microscope que précédemment (fig. 1.3) avec le même objectif et le même laser. Le sténopé a un diamètre de  $10 \mu\text{m} \approx 1 \text{ AU}$ .

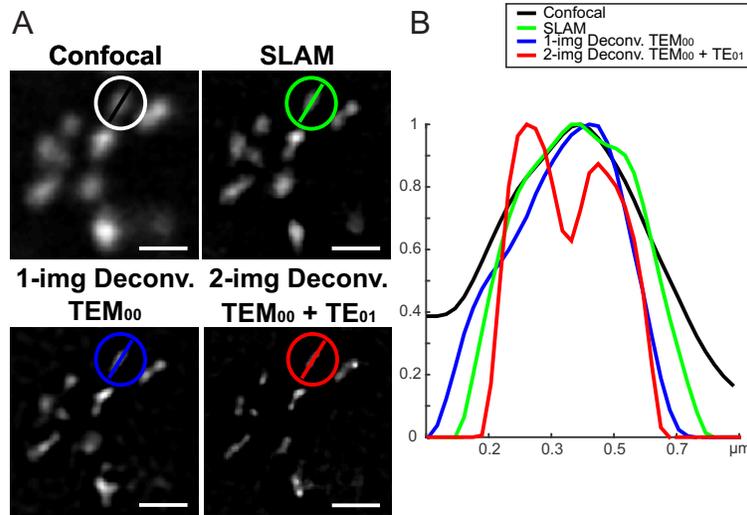


FIGURE 2.10 – *A/* Comparaison entre les images confocales, SLAM et déconvolution avec une ( $\text{TEM}_{00}$ ) ou deux images ( $\text{TEM}_{00}$  et  $\text{TE}_{01}$ ) utilisant la régularisation L2-L1 à préservation de bords. Barre d'échelle :  $1 \mu\text{m}$ . *B/* Profils intégrés de 10 pixels de large sur les lignes présentes en *A/*. *Noir* : confocale. *Vert* : SLAM. *Bleu* : déconvolution avec une image. *Rouge* : déconvolution avec deux images.

Ici encore, la fig. 2.10 compare les améliorations obtenues avec la méthode SLAM et la déconvolution à une et deux images. L'image confocale a, là encore, été filtrée avec un filtre gaussien de largeur à mi-hauteur de deux pixels pour éliminer le bruit et faciliter la comparaison. Les images sont présentées, en fig. 2.10-A et les cercles indiquent la zone où les profils ont été pris. Le même type d'amélioration qu'en fig. 2.9 est observé ici comme l'illustrent les profils à la fig. 2.10-B où l'on distingue une structure seulement visible à l'aide de la déconvolution utilisant deux images.

La section suivante présente deux autres faisceaux laser qui peuvent aider la déconvolution à retrouver encore plus de contenu de haute fréquence, et ainsi obtenir des images avec une meilleure résolution. Ces deux faisceaux laser sont les faisceaux Bessel-Gauss d'ordre 0 et 1.

## 2.5 Réglage des paramètres de déconvolution

Comme présenté à la section 2.2, il est nécessaire de régler manuellement plusieurs paramètres pour obtenir une déconvolution optimale. Cette section a pour but de détailler la méthode suivie pour choisir le bon paramètre pour la déconvolution. Pour ces tests nous avons utilisé des images simulées de microscopie confocale telles que celles présentées en section 2.1, c'est-à-dire quatre séries de quatre sources ponctuelles disposées à distances verticales et horizontales variables de 20 et 30 pixels. Cependant, pour accentuer les effets et avoir une comparaison plus facile, nous avons utilisé un pixel beaucoup plus grand (50 nm).

### 2.5.1 Réglage du paramètre de la régularisation Tikhonov

La régularisation Tikhonov, présentée en section 2.2, est une régularisation quadratique empêchant l'amplification du bruit de la déconvolution en appliquant un lissage par les différences finies sur l'image. L'équation (2.15) rappelle l'expression de cette régularisation.

$$\phi_{\text{prio}}(x) = \mu \sum_{i,j} [x_{i+1,j} - x_{i,j}]^2 + \mu \sum_{i,j} [x_{i,j+1} - x_{i,j}]^2. \quad (2.15)$$

L'expression à minimiser  $\phi_{\text{MAP}}(x)$  s'écrit dans le cas de la déconvolution à une image :

$$\phi_{\text{MAP}}(x) = (Hx - y)^T W (Hx - y) + \mu \left( \sum_{i,j} [x_{i+1,j} - x_{i,j}]^2 + \sum_{i,j} [x_{i,j+1} - x_{i,j}]^2 \right). \quad (2.16)$$

Le paramètre à régler est ici le paramètre  $\mu$  qui permet d'ajuster la force de la régularisation à appliquer lors de la déconvolution. La fig. 2.11 montre plusieurs résultats de déconvolution avec différents réglages du paramètre  $\mu$  et les compare à l'image originale (en fig. 2.11-A). Si le paramètre  $\mu$  est trop élevé, le lissage sera trop fort et l'image déconvoluée pourra devenir plus floue que l'original (fig. 2.11-B image de gauche). Si le paramètre  $\mu$  est trop faible, la déconvolution amplifiera le bruit de l'image (fig. 2.11-B image de droite). Le bon réglage du paramètre donne une déconvolution efficace et minimise l'amplification du bruit et les artéfacts qui y sont liés.

Comme énoncé précédemment, la régularisation Tikhonov n'est pas très efficace pour gérer le bruit et même avec un réglage du paramètre le plus optimal possible, on retrouve des artéfacts sous forme d'anneaux autour des structures de l'image.

### 2.5.2 Réglage du paramètre de la régularisation à préservation de bords

La régularisation à préservation de bords, présentée en section 2.2, est une régularisation non quadratique dont le but est identique à la régularisation Tikhonov. Cette régularisation de type L2-L1 agit comme une régularisation quadratique pour les faibles fréquences spatiales de l'image et de manière linéaire pour les hautes fréquences. Cela permet de déconvoluer plus

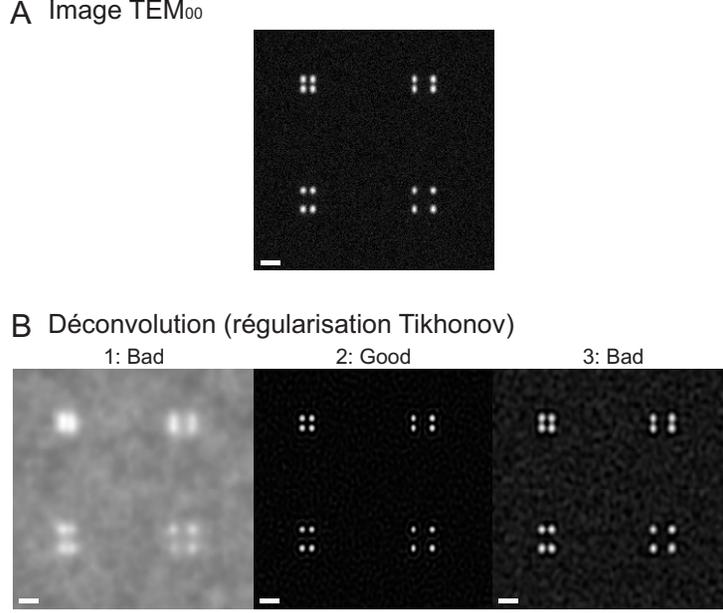


FIGURE 2.11 – Exemple de déconvolution à une image utilisant la régularisation Tikhonov montrant plusieurs réglages du paramètre  $\mu$ . En *A*) est l'image originale prise avec le faisceau  $TEM_{00}$  et en *B*) sont présentés plusieurs exemples de déconvolution avec des paramètres  $\mu$  différents (ex : 1, 0.1, 0.01). Le paramètre utilisé pour l'image centrale donne le meilleur résultat de déconvolution, sans amplification du bruit ni d'artéfacts ni de sur-lissage. Barre d'échelle : 1  $\mu\text{m}$ .

facilement sans ajouter d'artéfacts liés à l'amplification du bruit. L'équation (2.17) rappelle l'expression de cette régularisation de type L2-L1 utilisée ici.

$$\phi_{\text{prio}}(x) = \lambda_0 \sum_r \left[ \frac{\|\nabla \hat{x}(r)\|}{\theta_r} - \ln \left( 1 + \frac{\|\nabla \hat{x}(r)\|}{\theta_r} \right) \right]. \quad (2.17)$$

Pour cette régularisation, il y a deux paramètres à régler, le paramètre  $\lambda_0$ , qui joue le même rôle que le paramètre  $\mu$  de la régularisation Tikhonov, et le paramètre  $\theta_r$ . Comme mentionné à la section 2.2 le paramètre  $\theta_r$  sera réglé de manière globale, c'est-à-dire le même pour tous les pixels de l'image. Il faudra donc tester un certain nombre de couples de paramètre  $\lambda_0 - \theta_r$  pour trouver le bon réglage et obtenir une déconvolution de bonne qualité. La fig. 2.12 montre plusieurs résultats de déconvolution avec différents réglages du couple de paramètre  $\lambda_0 - \theta_r$  et les compare à l'image originale (en fig. 2.11-A). Les images de gauche et de droite de la fig. 2.12-B montrent deux exemples de mauvais réglages des deux paramètres. Dans ce cas, il est plus difficile de régler les paramètres que dans le cas de la régularisation Tikhonov puisqu'il ne s'agit plus de simplement d'augmenter ou de réduire un paramètre selon le résultat obtenu. On remarquera cependant que les deux paramètres sont partiellement liés. Lorsque  $\theta_r$  augmente (par rapport à la valeur optimale) il faut également augmenter  $\lambda_0$  pour garder un rapport

$\frac{\lambda_0}{\theta_r}$  similaire et ainsi garder un bon réglage de la première partie de l'équation (2.17). Vu la manière dont les deux paramètres sont liés, il est conseillé de tenter de régler  $\theta_r$  en premier et d'ajuster  $\lambda_0$  ensuite. Bien évidemment cela n'empêchera pas de faire des réglages successifs de ces deux paramètres.

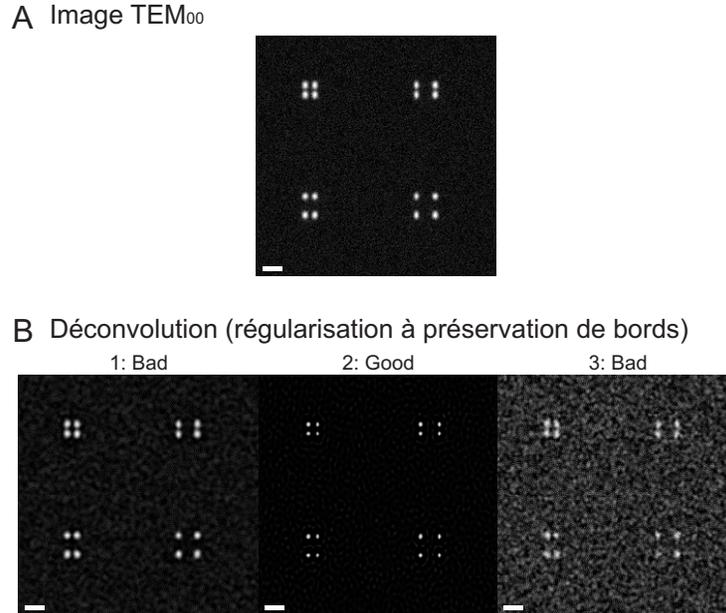


FIGURE 2.12 – Exemple de déconvolution à une image utilisant la régularisation à préservation de bords montrant plusieurs réglages des paramètres  $\lambda_0$  et  $\theta_r$ . *A/* est l'image originale prise avec le faisceau  $TEM_{00}$  et en *B/* sont présentés plusieurs exemples de déconvolution avec des paramètres  $\lambda_0$  différents (ex : 1, 0.01, 0.0001). Les paramètres utilisés pour l'image centrale donnent le meilleur résultat de déconvolution, sans amplification du bruit ni artéfacts ni sur-lissage. Barre d'échelle : 1  $\mu\text{m}$ .

Dans le cas de la déconvolution à deux images, les paramètres à régler restent identiques. La fig. 2.13 montre plusieurs résultats de déconvolution à deux images avec différents réglages du couple de paramètre  $\lambda_0 - \theta_r$  et les compare à l'image originale (en fig. 2.13-A à gauche).

En regardant les images de gauche et de droite des figs. 2.12 et 2.13, on remarque que les résultats de déconvolution peuvent être drastiquement différents lorsque les paramètres sont mal réglés. Il est donc important d'effectuer un bon échantillonnage des valeurs de paramètres pour trouver les bonnes « zones » de valeurs de paramètres et ensuite faire un réglage fin des paramètres pour obtenir le meilleur résultat possible.

On rappellera que, dans le cas présent, les méthodes proposées par [118] et [122] pour trouver automatiquement les paramètres de déconvolution ne peuvent pas s'appliquer puisque les tailles de nos PSF (largeur en nombre de pixels) sont hors des valeurs recommandées pour ces méthodes (largeur de l'ordre de la dizaine pixels). On rappellera également que nous prenons des images avec des PSF aussi grandes (en nombre de pixels) puisque nous voulons

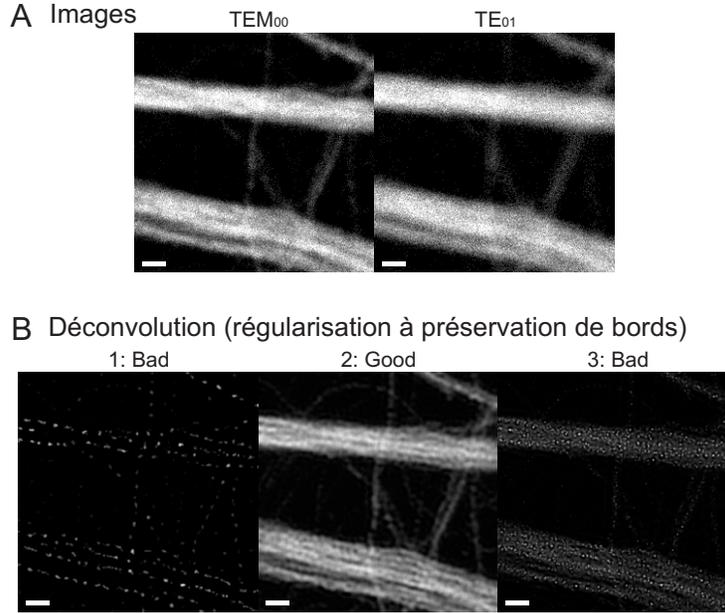


FIGURE 2.13 – Exemple de déconvolution à deux images utilisant la régularisation à préservation de bords montrant plusieurs réglages des paramètres. En *A/* sont présentées les images originales prises avec les faisceaux  $TEM_{00}$  et  $TE_{01}$  et en *B/* sont présentés plusieurs exemples de déconvolution avec des paramètres  $\lambda_0$  différents (ex : 1, 0.01, 0.0001). Les paramètres utilisés pour l'image centrale donnent le meilleur résultat de déconvolution, sans amplification du bruit ni artéfacts ni sur-lissage. Barre d'échelle :  $1.2 \mu\text{m}$ .

échantillonner correctement le trou du faisceau beigne  $TE_{01}$ .

## 2.6 Les faisceaux Hermite-Gauss

Comme montré en section 2.1.1, plus une PSF a un contenu élevé de hautes fréquences, plus la déconvolution pourra récupérer d'informations de hautes fréquences et donc l'image reconstruite aura une meilleure résolution. Dire qu'une PSF a un contenu fréquentiel élevé en hautes fréquences est équivalent à dire qu'une PSF possède beaucoup de structures fines. L'idée ici est donc de trouver puis de tester des PSF ayant plus de structures fines que les PSF  $TEM_{00}$  et  $TE_{01}$  pour tenter d'améliorer encore le résultat de la déconvolution. L'hypothèse est que plus la PSF contient des hautes fréquences moins la déconvolution aura de difficultés à retrouver les hautes fréquences de l'image (qui sont noyées sous le bruit). Pour cela, les modes Hermite-Gauss semblent de bons candidats.

### 2.6.1 Résultats théoriques avec les modes Hermite-Gauss

Les modes Hermite-Gauss sont une famille de solutions de l'équation d'onde paraxiale, laquelle s'écrit :

$$\nabla_T^2 A - 2jk \frac{\partial A}{\partial z} = 0, \quad (2.18)$$

où  $A$  est l'amplitude complexe de l'onde,  $\nabla_T^2 = \frac{\partial^2}{\partial x^2} + \frac{\partial^2}{\partial y^2}$  l'opérateur laplacien transverse et  $k$  le nombre d'onde.

La résolution de cette équation d'onde permet donc d'obtenir les amplitudes complexes des modes Hermite-Gauss (voir [209] chapitre 03) :

$$U_{n,m}(x, y, z) = A_{n,m} \frac{w_0}{w(z)} G_n \left[ \frac{\sqrt{2}x}{w(z)} \right] G_m \left[ \frac{\sqrt{2}y}{w(z)} \right] \exp \left[ -jkz - jk \frac{x^2 + y^2}{2R(z)} + j(n+m+1)\zeta(z) \right], \quad (2.19)$$

avec  $G_n[u] = H_n(u) e^{-\frac{u^2}{2}}$ ,  $H_n$  représentant le polynôme de Hermite d'ordre  $n$  et  $\zeta(z) = \tan^{-1} \left( \frac{z}{z_0} \right)$  la phase de Gouy.  $R(z) = z \left( 1 + \left( \frac{z_R}{z} \right)^2 \right)$  correspond au rayon de courbure du front d'onde et  $w(z) = w_0 \sqrt{1 + \left( \frac{z_R}{z} \right)^2}$  la taille du faisceau.

La fig. 2.14 montre des résultats de simulation de faisceaux Hermite-Gauss ayant un support spatial similaire au faisceau  $TEM_{00}$ . L'objectif est de pousser plus loin le test d'efficacité de la déconvolution lorsqu'une PSF à haut contenu fréquentiel, ayant tout de même un grand support (de grande taille), est utilisée.

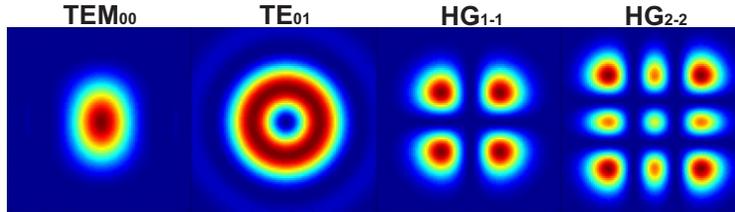


FIGURE 2.14 – Comparaison entre les faisceaux  $TEM_{00}$  et  $TE_{01}$  théoriques et des modes Hermite-Gauss d'ordre 1-1 ( $HG_{1-1}$ ) et 2-2 ( $HG_{2-2}$ ) mis à échelle.

La fig. 2.15 montre les résultats de déconvolution en utilisant les mêmes données que pour les simulations en section 2.3.1. Des images confocales sont simulées pour chacune des PSF ( $TEM_{00}$ ,  $TE_{01}$ ,  $HG_{1-1}$  et  $HG_{2-2}$ ) et l'algorithme de déconvolution à deux images utilisant la régularisation à préservation des bords est utilisé. Dans le cas de l'utilisation des images prises avec les modes Hermite-Gauss, «  $HG_{1-1} \& HG_{2-2}$  » signifie qu'une image est prise avec le mode  $HG_{1-1}$  et que la seconde est, avec le mode  $HG_{2-2}$ , tournée de 45 degrés dans le plan. «  $HG_{2-2} \& HG_{2-2}$  » signifie que les deux images sont prises avec le mode  $HG_{2-2}$  mais que pour la seconde, le mode  $HG_{2-2}$  est tourné de 45 degrés dans le plan. Le mode Hermite-Gauss

utilisé pour la seconde image est tourné de 45 degrés pour permettre de combler l'espace des fréquences de manière le plus isotrope possible.

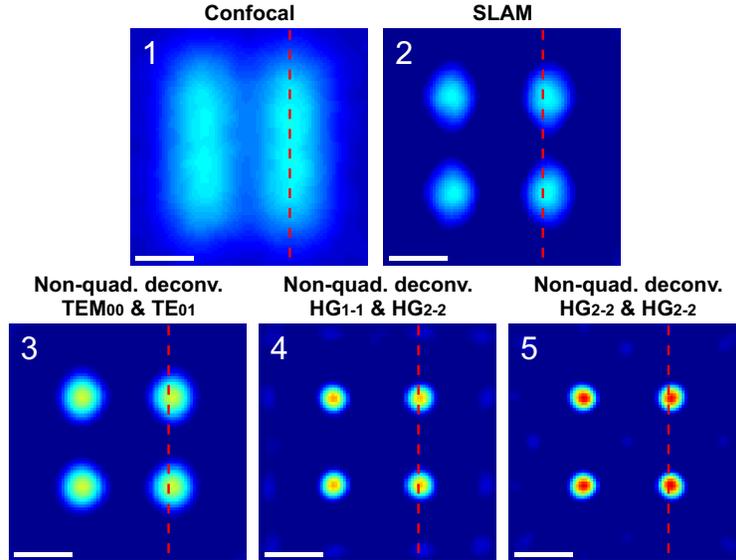


FIGURE 2.15 – Résultats de déconvolution (3-5) comparés aux images confocales (1) et SLAM (2) sur les données simulées représentant quatre points séparés par 30 pixels (300 nm). Les quatre points de l'image originale sont trop petits pour être visibles sur une image (chaque point ne fait qu'un pixel). Non-quad. deconv. est l'abréviation pour la déconvolution avec la régularisation non quadratique (L2-L1 à préservation de bords). La PSF du faisceau gaussien polarisé verticalement est abrégée par  $TEM_{00}$  et celle pour le faisceau Laguerre-Gauss polarisé azimuthalement est  $TE_{01}$ .  $TEM_{00}&TE_{01}$  est utilisé pour spécifier que la méthode de déconvolution avec les deux couples image-PSF est choisie.  $HG_{1-1}&HG_{2-2}$  indique que les modes Hermite-Gauss d'ordres 1-1 et 2-2 sont utilisés par la méthode de déconvolution avec les deux couples image-PSF et  $HG_{2-2}&HG_{2-2}$  indique que deux modes Hermite-Gauss d'ordre 2-2 à 45 degrés sont utilisés avec la même méthode de déconvolution. Barre d'échelle : 200 nm.

La fig. 2.16 montre les profils tracés en rouge sur la fig. 2.15.

On remarque, en observant à la fois les images à la fig. 2.15 et les profils à la fig. 2.16, que l'utilisation des modes Hermite-Gauss pour l'acquisition d'images permet une meilleure reconstruction par déconvolution que lorsque les modes  $TEM_{00}$  et  $TE_{01}$  sont utilisés. De plus, plus l'ordre du mode Hermite-Gauss est élevé meilleure est la reconstruction. Nous nous sommes restreints à des modes Hermite-Gauss d'ordre 2-2 pour limiter les difficultés possibles de réalisations expérimentales.

### 2.6.2 Génération expérimentale des modes Hermite-Gauss

Pour générer les modes Hermite-Gauss, nous avons repris un principe similaire à celui utilisé par N. Kaya [210], soit introduire un déphasage dans le trajet du signal. Le but principal était d'éviter d'avoir recours à des techniques trop complexes et sensibles (comme Shu-Chun

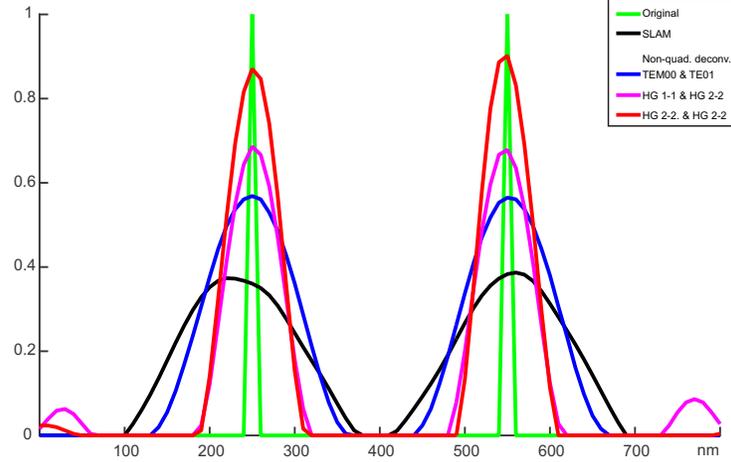


FIGURE 2.16 – Les profils correspondent aux lignes rouges tracées sur la fig. 2.15. Les points simulés sont représentés en *vert.* Non-quad. deconv. est l’abréviation pour la déconvolution avec la régularisation non quadratique (L2-L1 à préservation de bords). La PSF du faisceau gaussien polarisé verticalement est abrégé par TEM<sub>00</sub> et celle pour le faisceau Laguerre-Gauss polarisé azimuthalement est TE<sub>01</sub>. TEM<sub>00</sub>&TE<sub>01</sub> est utilisé pour spécifier que la méthode de déconvolution avec les deux couples image-PSF est choisie. HG<sub>1-1</sub>&HG<sub>2-2</sub> indique que les modes Hermite-Gauss d’ordres 1-1 et 2-2 sont utilisés par la méthode de déconvolution avec les deux couples image-PSF et HG<sub>2-2</sub>&HG<sub>2-2</sub> indique que deux modes Hermite-Gauss d’ordre 2-2 à 45 degrés sont utilisés avec la même méthode de déconvolution.

Chu [211]) puisque le but final est d’améliorer la résolution d’un microscope optique, confocal ou à deux photons, sans avoir à faire de modifications importantes sur le montage.

Au lieu d’utiliser un modulateur de phase à cristaux liquides (Spatial Light Modulator), comme dans N. Kaya [210], pour créer les modes HG<sub>1-1</sub> et HG<sub>2-2</sub>, nous avons fabriqué des miroirs dont la surface a été gravée par photolithographie. Le schéma gravé a été étudié pour créer des interférences destructives à la jonction entre deux épaisseurs. Le déphasage devant être de  $\pi$ , la différence d’épaisseur a été calculée pour correspondre à la longueur d’onde du laser utilisé (532 nm). Pour pouvoir induire un déphasage de  $\pi$ , il faut créer une différence de chemin optique de  $\frac{2\pi 2L}{\lambda}$ , où L est la différence d’épaisseur en question. On obtient donc une différence d’épaisseur  $L = \frac{\lambda}{4}$ . Vu que la méthode utilisée ne correspond pas à la création de modes laser dans une cavité, les faisceaux créés ne sont pas des ‘modes’ à proprement parler. Nous nous attendons donc à avoir quelques défauts (rebonds dus à la diffraction). Le schéma suivi est présenté à la fig. 2.17.

Pour tester ensuite l’efficacité des miroirs, nous avons imagé l’échantillon de nano-sphères fluorescentes de 100 nm avec les miroirs placés sur le chemin optique. Les PSF mesurées au point focal sont montrées sur la figure 2.18 et sont à comparer aux simulations à la fig. 2.14 dont nous souhaitons nous rapprocher.

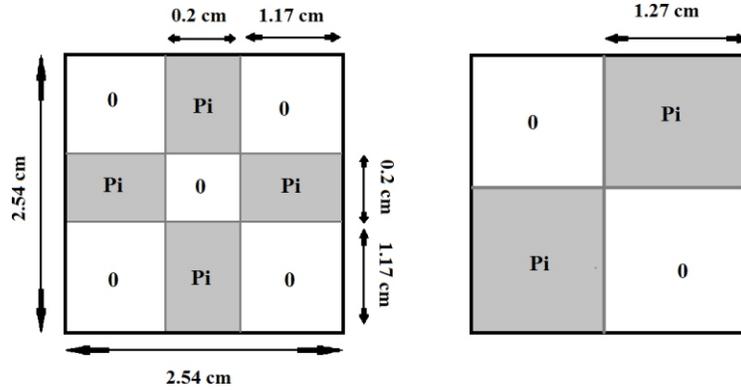


FIGURE 2.17 – Schémas des déphasages induits par les miroirs pour créer les modes Hermite-Gauss  $HG_{2-2}$  (gauche) et  $HG_{1-1}$  (droite). Le déphasage est induit par des couches d'épaisseur d'argent spécifiques déposées sur un miroir d'argent.

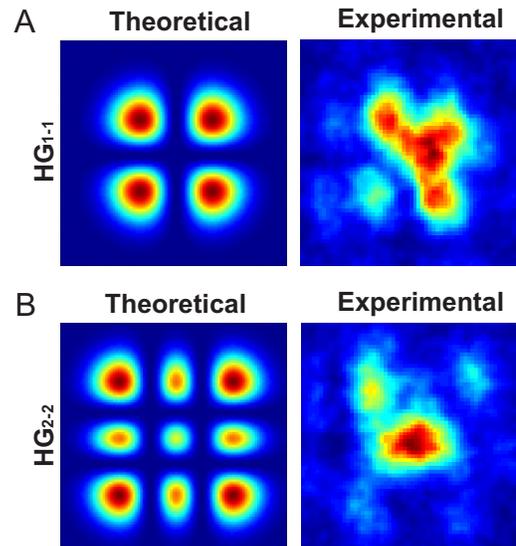


FIGURE 2.18 – PSF mesurées sur des nano-sphères fluorescentes de 100 nm (Fluosphere carboxylate-modified microspheres, orange fluorescence 540/560). A/ PSF du mode Hermite-Gauss  $HG_{1-1}$ , B/ PSF du mode Hermite-Gauss  $HG_{2-2}$ .

Les PSF obtenues par cette méthode, montrées à la fig. 2.18, ne sont pas aussi nettes que celles attendues. Ceci peut être dû aux artéfacts de diffraction observés sur le faisceau qui affectent sa forme globale. Du fait de la différence d'épaisseur de nos miroirs, de tels artéfacts étaient attendus (diffraction) mais leur impact est plus important que prévu.

### 2.6.3 Résultats expérimentaux avec les modes Hermite-Gauss

Bien que les PSF des faisceaux Hermite-Gauss ne soient pas conformes aux attentes, il est toujours possible de déconvoluer les images obtenues avec ces PSF. La fig. 2.19 montre le

même champ de l'échantillon de nano-sphères pris avec les faisceaux  $TEM_{00}$ ,  $HG_{1-1}$  et  $HG_{2-2}$  ainsi que les déconvolutions à une image qui y sont associées.

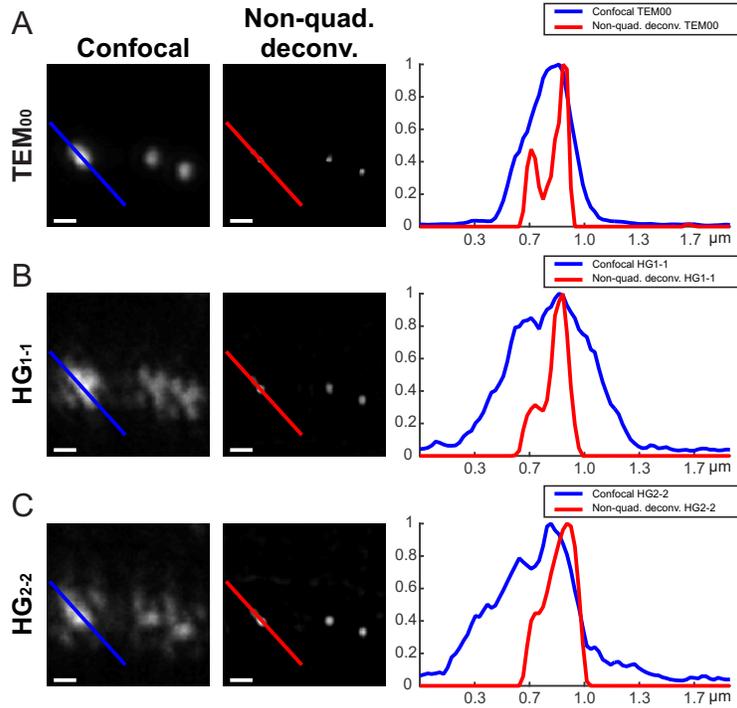


FIGURE 2.19 – Résultats expérimentaux de déconvolution avec les faisceaux Hermite-Gauss. *A/* Images prises avec le faisceau  $TEM_{00}$ . *B/* Images prises avec le faisceau  $HG_{1-1}$ . *C/* Images prises avec le faisceau  $HG_{2-2}$ . La colonne de *gauche* montre les images confocales prises avec les différents modes laser. La colonne du *milieu* montre le résultat de déconvolution à une image des images confocales. La colonne de *droite* montre les profils tracés sur les images, en *bleu* les images confocales et en *rouge* les résultats de déconvolution. Barre d'échelle : 500 nm.

On remarque, notamment en observant les profils tracés le long de deux nano-sphères proches, que les résultats de déconvolution avec chacun des faisceaux Hermite-Gauss donnent des images avec une résolution inférieure à celle de l'image déconvoluée à partir de l'image confocale classique (prise avec le faisceau  $TEM_{00}$ ). Cela s'explique par le fait que les PSF des faisceaux Hermite-Gauss sont tellement distordues qu'elles n'ont rien à voir avec un vrai faisceau Hermite-Gauss. Elles sont même pires que la PSF du faisceau  $TEM_{00}$  dans le sens où elles ne possèdent pas vraiment de structures fines mais sont toutes deux ( $HG_{1-1}$  et  $HG_{2-2}$ ) plus grandes.

N'ayant pas réussi à générer proprement des faisceaux Hermite-Gauss simplement, nous nous sommes tournés vers un autre type de faisceaux : les faisceaux Bessel-Gauss.

## 2.7 Utilisation des faisceaux Bessel-Gauss

Les faisceaux Bessel-Gauss constituent une famille de faisceaux qui est généralement utilisée en microscopie à feuillet de lumière ([172]), en microscopie à profondeur de champ étendue ([174,176,177]) ou en microscopie à deux photons grâce à leurs propriétés de non diffraction sur une longue distance ([168,169]). Ici nous utilisons les faisceaux Bessel-Gauss en microscopie confocale ([181–183,212]) en utilisant le sténopé du microscope confocal pour éliminer la fluorescence des lobes secondaires ainsi que pour garder le sectionnement optique. Pour un sténopé de diamètre d'environ une Airy Unit (1 AU), les lobes secondaires des faisceaux Bessel-Gauss ne sont plus visibles. C'est dans cette configuration que nous allons imager avec les faisceaux Bessel-Gauss. Comme les faisceaux Bessel-Gauss d'ordres 0 et 1 ont un point focal plus petit que les faisceaux  $TEM_{00}$  et  $TE_{01}$ , la résolution après déconvolution pourrait être améliorée.

### 2.7.1 Présentation et résultats théoriques

Les faisceaux Bessel-Gauss ont un spot focal central plus petit que celui des faisceaux classiques tels que le  $TEM_{00}$  ou le  $TE_{01}$ , ce qui donne une PSF à la limite de diffraction de la lumière plus petite et donc une meilleure résolution ([181–184,212]). Nous proposons d'utiliser ici les faisceaux Bessel-Gauss d'ordre 0 de polarisation linéaire et d'ordre 1 de polarisation azimutale pour remplacer les faisceaux  $TEM_{00}$  de polarisation linéaire et  $TE_{01}$  de polarisation azimutale.

Pour pouvoir utiliser les faisceaux Bessel-Gauss nous avons modifié le microscope pour y incorporer un couple axicon-lentille qui permet d'obtenir un anneau mince de lumière (comme présenté dans [174]). L'anneau est ensuite relayé jusqu'à l'objectif à l'aide de télescopes puis l'objectif transforme cet anneau mince en faisceau Bessel-Gauss (puisque les faisceaux Bessel-Gauss et les anneaux de lumière forment une paire de transformées de Fourier). Un iris est placé avant l'axicon pour nettoyer le faisceau et s'assurer que le faisceau est du bon diamètre à l'entrée de l'axicon pour qu'un maximum de puissance soit concentré sur le lobe central du faisceau Bessel-Gauss au point focal.

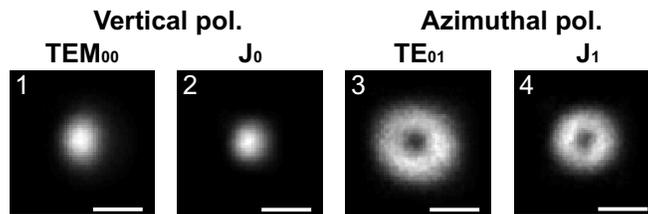


FIGURE 2.20 – Nano-sphères fluorescentes de 100 nm (Fluosphere carboxylate-modified microspheres, orange fluorescence 540/560) observées au microscope confocal avec les différents faisceaux. Sténopé de 15  $\mu\text{m}$  diamètre. Longueur d'excitation : 532 nm. Barre d'échelle : 300 nm.

La fig. 2.20 compare les faisceaux gaussien  $TEM_{00}$ , Laguerre-Gauss  $TE_{01}$  et Bessel-Gauss d'ordres 0 et 1. On observe bien que les faisceaux Bessel-Gauss ont un spot focal plus petit que leurs homologues  $TEM_{00}$  et  $TE_{01}$ .

Dans cette section, nous comparons les résultats de déconvolution entre des images acquises avec les faisceaux Bessel-Gauss et les images acquises avec les faisceaux  $TEM_{00}$  et  $TE_{01}$  en utilisant les mêmes données que pour les simulations en section 2.3.1.

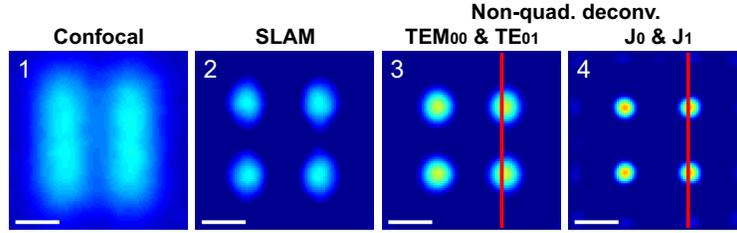


FIGURE 2.21 – Résultats de déconvolution comparés aux images confocales et SLAM sur les données simulées représentant quatre points séparés par 30 pixels (300 nm). Les quatre points de l'image originale sont trop petits pour être visibles sur une image (chaque point ne fait qu'un pixel). Non-quad. deconv. est l'abréviation pour la déconvolution avec la régularisation non quadratique (L2-L1 à préservation de bords). La PSF du faisceau gaussien polarisé verticalement est abrégée par  $TEM_{00}$  et celle pour le faisceau Laguerre-Gauss polarisé azimuthalement est  $TE_{01}$ .  $TEM_{00}&TE_{01}$  et  $J_0&J_1$  sont utilisés pour spécifier que la méthode de déconvolution avec les deux couples image-PSF est choisie.  $J_0$  et  $J_1$  font référence aux faisceaux Bessel-Gauss d'ordres 0 et 1 respectivement. Barre d'échelle : 200 nm.

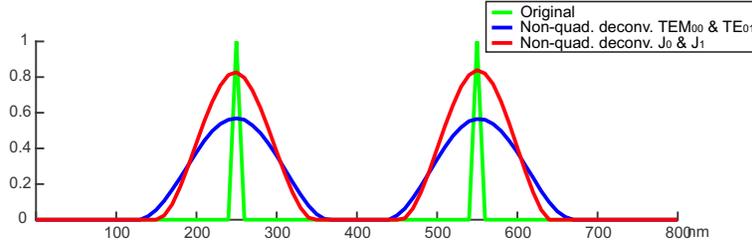


FIGURE 2.22 – Les profils correspondent aux lignes rouges tracées sur la fig. 2.21. Les points simulés sont représentés en *vert.* Non-quad. deconv. est l'abréviation pour la déconvolution avec la régularisation non quadratique (L2-L1 à préservation de bords). La PSF du faisceau gaussien polarisé verticalement est abrégée par  $TEM_{00}$  et celle pour le faisceau Laguerre-Gauss polarisé azimuthalement est  $TE_{01}$ .  $TEM_{00}&TE_{01}$  et  $J_0&J_1$  sont utilisés pour spécifier que la méthode de déconvolution avec les deux couples image-PSF est choisie.  $J_0$  et  $J_1$  font référence aux faisceaux Bessel-Gauss d'ordres 0 et 1 respectivement.

Les figs. 2.21 et 2.22 montrent l'amélioration de résolution obtenue en utilisant les faisceaux Bessel-Gauss d'ordres 0 et 1 pour l'acquisition au lieu des faisceaux  $TEM_{00}$  et  $TE_{01}$ . On remarque que l'utilisation des faisceaux Bessel-Gauss en remplacement des faisceaux  $TEM_{00}$

et  $TE_{01}$  permet bien à la déconvolution de retrouver plus d'informations de hautes fréquences, ce qui produit une image ayant une meilleure résolution.

Le tableau 2.2 compare les largeurs à mi-hauteur des PSF résiduelles pour les déconvolutions à deux images avec la régularisation non quadratique (à préservation de bords) utilisant les faisceaux  $TEM_{00}$  et  $TE_{01}$  ou les faisceaux  $J_0$  et  $J_1$ .

Méthodes	FWHM Verticale (nm)	FWHM Horizontale (nm)
Confocale	$310 \pm 10$	$270 \pm 10$
SLAM	$150 \pm 10$	$120 \pm 10$
Non-quad deconv. $TEM_{00}$ and $TE_{01}$	$120 \pm 10$	$110 \pm 10$
Non-quad deconv. $J_0$ and $J_1$	$90 \pm 10$	$90 \pm 10$

TABLE 2.2 – Largeur à mi-hauteur résiduelle de la PSF prise sur l'objet ponctuel pour chaque méthode testée dans les deux directions (verticale et horizontale). Valeurs prises sur les données présentées à la fig. 2.21 et 2.22. Toutes ces valeurs sont établies pour une longueur d'onde de 532 nm.

## 2.7.2 Résultats expérimentaux sur nano-sphères

Nous allons ici comparer les résultats de déconvolution à deux images utilisant les faisceaux gaussien  $TEM_{00}$  et Laguerre-Gauss  $TE_{01}$  avec la déconvolution à deux images utilisant les faisceaux Bessel-Gauss d'ordres 0 et 1 sur un échantillon de nano-sphères. Toutes les images ont été acquises sur le même microscope confocal (fig. 1.3) avec le même objectif et laser d'excitation à 532 nm.

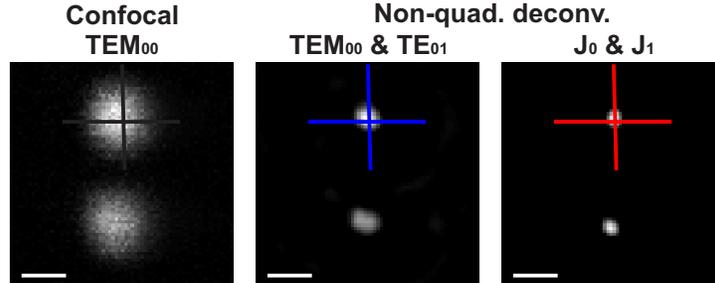


FIGURE 2.23 – Comparaison entre l'utilisation des faisceaux  $TEM_{00}$  et  $TE_{01}$  et Bessel-Gauss d'ordres 0 et 1 sur des données expérimentales d'un échantillon de nano-sphères de 100 nm de diamètre. *Gauche* : image confocale classique. *Milieu* : déconvolution multi-images avec les faisceaux  $TEM_{00}$  et  $TE_{01}$ . *Droite* : déconvolution multi-images avec les faisceaux Bessel-Gauss d'ordre 0 et 1. Barre d'échelle : 340 nm.

La fig. 2.23 nous montre le résultat de la déconvolution à deux images utilisant les faisceaux  $TEM_{00}$  et  $TE_{01}$  et la compare à la déconvolution à deux images utilisant les faisceaux Bessel-Gauss d'ordres 0 et 1. La fig. 2.24 compare les largeurs à mi-hauteur verticale et horizontale d'une nano-sphère. L'utilisation des faisceaux Bessel-Gauss d'ordres 0 et 1 à la place des faisceaux  $TEM_{00}$  et  $TE_{01}$  donne une amélioration d'environ 40% sur la largeur à mi-hauteur

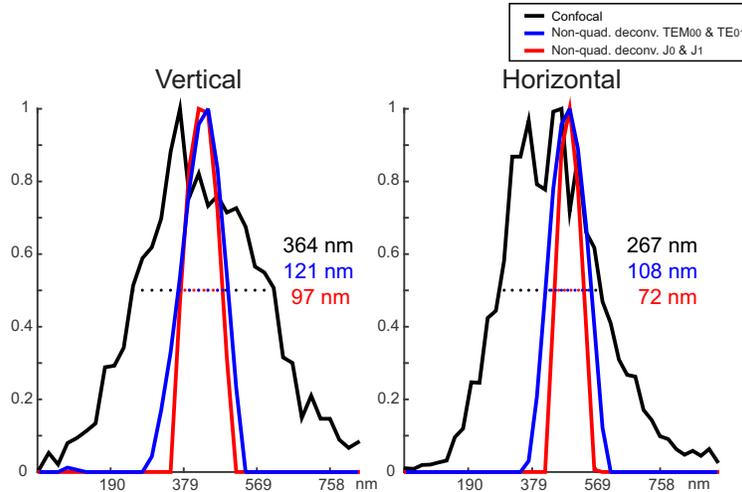


FIGURE 2.24 – Profils pris sur les images de la fig. 2.23. *Noir* : image confocale classique. *Bleu* : Résultat de la déconvolution multi-images avec les faisceaux  $TEM_{00}$  et  $TE_{01}$ . *Rouge* : Résultat de la déconvolution multi-images avec les faisceaux Bessel-Gauss d’ordre 0 et 1.

de la PSF résiduelle. Les nano-sphères observées ont un diamètre de 100 nm environ et sont remplies de molécules fluorescentes. Le profil d’une telle nano-sphère observée avec une PSF infiniment petite donnerait une largeur à mi-hauteur d’environ 50 nm.

### 2.7.3 Validation des résultats avec la microscopie STED en référence

Nous avons ensuite comparé l’amélioration apportée par la déconvolution à deux images avec les faisceaux Bessel-Gauss à une image STED de référence à l’aide d’un marquage de la protéine tubuline. Les images confocales et STED ont été prises sur un microscope STED avec un objectif à huile d’ouverture numérique  $NA = 1.4$ . Pour l’image confocale, un laser de longueur d’onde 640 nm et un sténopé de 0.8 AU ont été utilisés. Les images confocales avec faisceaux Bessel-Gauss ont été prises sur le microscope présenté à la fig. 1.3 avec l’objectif à eau d’ouverture numérique  $NA = 1.2$ , un laser d’excitation de longueur d’onde 532 nm et un sténopé de 1 AU. Le but de cette section est d’utiliser l’image STED comme image de référence et de montrer que les structures résolues par la déconvolution sont bien des structures présentes dans l’échantillon.

Les figs. 2.25 et 2.26 nous permettent de comparer un résultat de la déconvolution à deux images utilisant les faisceaux Bessel-Gauss à une image de microscopie STED. Nous pouvons voir qu’un grand nombre de structures qui ne sont pas visibles sur les images confocales le sont sur l’image déconvoluée. L’image STED nous sert ici de référence pour valider les résultats de la déconvolution. Il est important de noter que la déconvolution ne permet pas de surpasser la microscopie STED en terme de résolution, l’image STED servant ici de référence avec une haute résolution. Cependant toutes les structures retrouvées par la déconvolution sont bien

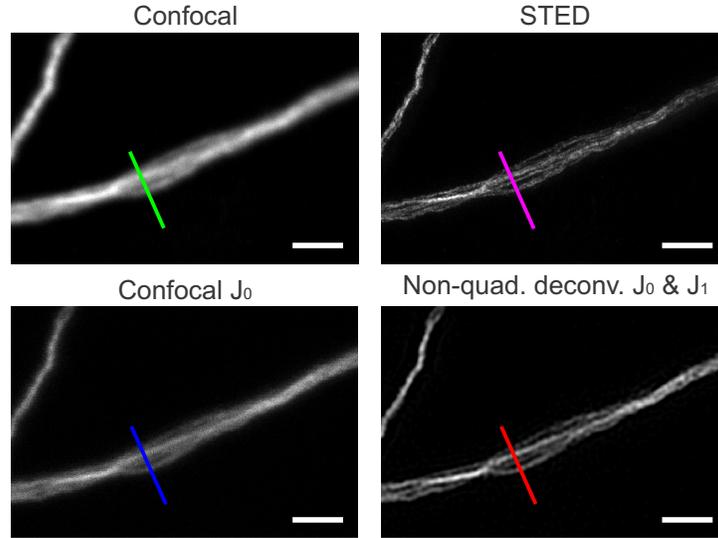


FIGURE 2.25 – Images du même champ comparant la déconvolution utilisant les faisceaux Bessel-Gauss et la microscopie STED. Confocal  $J_0$  réfère à l'image confocale prise avec le faisceau Bessel-Gauss d'ordre 0. Non-quad. deconv. est l'abréviation pour la déconvolution avec la régularisation non quadratique (L2-L1 à préservation de bords).  $J_0&J_1$  est utilisé pour spécifier que la méthode de déconvolution avec les deux couples image-PSF est choisie.  $J_0$  et  $J_1$  font référence aux faisceaux Bessel-Gauss d'ordre 0 et 1 respectivement. Barre d'échelle :  $1\mu m$ .

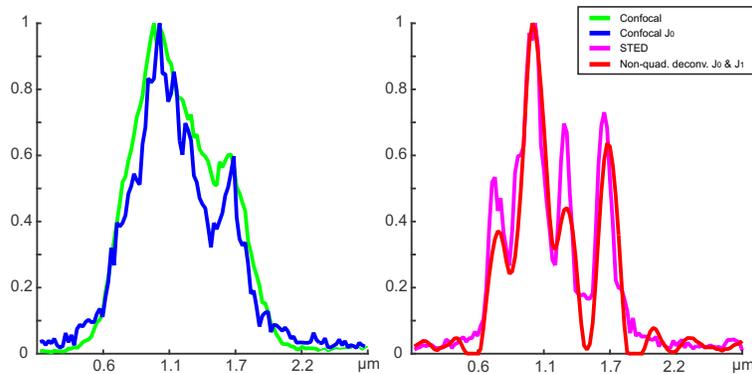


FIGURE 2.26 – Profils pris sur les images à la fig. 2.25. Vert : image confocale. Magenta : image STED. Bleu : image confocale prise avec le faisceau Bessel-Gauss d'ordre 0. Rouge : Déconvolution à deux images avec les faisceaux Bessel-Gauss d'ordre 0 et 1. Confocal  $J_0$  réfère à l'image confocale prise avec le faisceau Bessel-Gauss d'ordre 0. Non-quad. deconv. est l'abréviation pour la déconvolution avec la régularisation non quadratique (L2-L1 à préservation de bords).  $J_0&J_1$  est utilisé pour spécifier que la méthode de déconvolution avec les deux couples image-PSF est choisie.  $J_0$  et  $J_1$  font référence aux faisceaux Bessel-Gauss d'ordre 0 et 1 respectivement.

présentes dans l'image STED ; la déconvolution n'a ni créé de structures, ni fait disparaître de structures existantes.

## 2.8 Discussion

L'idée générale derrière les résultats présentés ici est que l'utilisation d'une PSF structurée, contenant plus de hautes fréquences lors de l'acquisition de l'image, permet d'aider les algorithmes de déconvolution à retrouver plus de détails de hautes fréquences dans les images. Le fait d'avoir une PSF avec un plus grand contenu en hautes fréquences permet à la déconvolution de séparer plus facilement le signal de haute fréquence du bruit, signal qui serait normalement noyé sous le bruit.

Il est aussi important de noter qu'en déconvolution, la taille de la PSF (en nombre de pixels) a une importance. Plus la PSF est grande, plus l'algorithme de déconvolution aura des difficultés à traiter les images correctement. Dans notre cas, la PSF est plus large que la moyenne avec un diamètre entre 20 et 30 pixels. Nous avons des PSF aussi larges pour deux raisons : la première est que nous voulons être capables de mesurer l'amélioration avec une bonne précision ; la seconde est que, comme nous utilisons des PSF en beignes, nous avons besoin de suffisamment de pixels pour résoudre correctement cette PSF. Le fait d'avoir une PSF aussi large nous empêche d'utiliser l'estimation automatique des paramètres proposée en [122] qui est prévue pour des PSF plus petites ( $\approx 10$  pixels). Nous avons donc du régler manuellement les paramètres de déconvolution.

L'utilisation des faisceaux Bessel-Gauss permet de bénéficier au maximum de l'ouverture numérique de notre objectif. Les faisceaux Bessel-Gauss sont créés par transformée de Fourier d'un anneau mince à l'ouverture arrière de l'objectif, cet anneau mince étant focalisé avec un angle proche de l'angle maximal de focalisation de l'objectif. Il serait donc impossible d'obtenir des faisceaux ayant un contenu de hautes fréquences plus élevé en utilisant des méthodes de transformation de faisceaux telles que celles que nous utilisons. Il est donc normal que nous n'ayons pas pu réaliser expérimentalement des faisceaux Hermite-Gauss ayant un contenu fréquentiel aussi important que souhaité.

Les faisceaux Bessel-Gauss d'ordres 0 et 1 sont les plus petits faisceaux qui peuvent être focalisés par un objectif de microscope. Si on considère l'ouverture arrière de l'objectif comme un plan de Fourier du plan focal de l'objectif, l'anneau de lumière, qui est transformé en un faisceau Bessel-Gauss au plan focal, représente les plus hautes fréquences spatiales que l'objectif est capable de transmettre. Le faisceau Bessel-Gauss contient donc le plus grand contenu de hautes fréquences possible, pour un objectif donné. De plus, l'utilisation du sténopé pour filtrer la fluorescence des lobes secondaires du faisceau Bessel-Gauss ajoute du contenu hautes fréquences à la MTF mesurée du faisceau Bessel-Gauss. Ce sont tous ces avantages qui font des faisceaux Bessel-Gauss de parfaits candidats pour la méthode d'imagerie avec déconvolution proposée ici.

Bien que la méthode proposée ne permette pas d'obtenir d'aussi bonne résolution que celles proposées par les méthodes telles que STED, PALM, STORM, le design expérimental est

beaucoup plus simple à mettre en œuvre et à utiliser que pour la microscopie STED et l'imagerie ne dépend pas de propriétés spécifiques de protéines fluorescentes comme en microscopie PALM ou STORM.

La limitation principale de la microscopie STED classique réside dans les hautes puissances du faisceau de déplétion nécessaires qui peuvent engendrer un photoblanchiment important et une phototoxicité élevée. Cette méthode peut cependant atteindre des largeurs à mi-hauteur de la PSF résiduelles de 20 nm [213]. Cette limitation a fait l'objet de nombreuses recherches ces dernières années et plusieurs méthodes ont été proposées pour résoudre ce problème lié à la très haute puissance nécessaire au fonctionnement de la microscopie STED. RESOLFT [214], protected STED [215], ou encore cw-STED [216] sont parmi les plus populaires de ces méthodes et les largeurs à mi-hauteur de la PSF résiduelles reportées restent dans les 50 nm. En créant spécifiquement des protéines fluorescentes pour une application de microscopie RESOLFT, il a été possible de descendre la largeur à mi-hauteur de la PSF résiduelle à 40 nm [217], mais cette amélioration s'est faite au prix d'une dépendance encore plus grande sur le type de molécules fluorescentes utilisées. Une autre difficulté des méthodes du type STED est la capacité à obtenir des images multi-couleurs. Il a été démontré qu'il est possible d'obtenir des images multi-couleurs en STED, jusqu'à quatre, mais au détriment de la résolution, avec une largeur à mi-hauteur résiduelle de la PSF de 80 nm [218,219].

Les méthodes telles que PALM ou STORM sont souvent regroupées sous le nom SMLM (Single Molecule Localisation Microscopy) et peuvent atteindre des largeurs à mi-hauteur de PSF résiduelle de 10 nm [213]. La limitation principale de ces méthodes de microscopie est leur dépendance dans des propriétés spécifiques à certaines molécules fluorescentes, photoactivation pour la microscopie PALM et clignotement pour la microscopie STORM. De plus, l'imagerie en 3D est particulièrement difficile pour ces méthodes et la résolution temporelle est de l'ordre de quelques minutes. Certains algorithmes proposent une résolution temporelle de l'ordre de quelques secondes, mais avec une largeur à mi-hauteur de la PSF résiduelle plus large (60 nm) [220].

La microscopie SIM offre, quant à elle, une résolution de l'ordre de 100 nm avec moins de limitations que les autres méthodes de superrésolution, mais avec une résolution temporelle limitée par le temps nécessaire pour appliquer l'illumination. La microscopie SIM non linéaire, ou saturated SIM, permet d'obtenir une largeur à mi-hauteur de la PSF résiduelle de 40 nm [221] ( $0.08 \lambda$  à 488 nm) en générant des harmoniques à hautes fréquences de l'illumination. Cependant ces harmoniques sont générés par saturation des molécules fluorescentes, rendant la microscopie SIM non linéaire dépendante des propriétés de molécules fluorescentes.

Certains auteurs ont comparé les résolutions, avantages et inconvénients de chacune de ces méthodes et ont mesuré les largeurs à mi-hauteur des PSF résiduelles sur des échantillons biologiques [50]. Ils ont mesuré des largeurs à mi-hauteur de 50 nm pour la microscopie STED,

50 nm pour les microscopies SMLM et 100 nm pour la microscopie SIM. Dans leur comparaison ils ont montré les limitations principales des méthodes mentionnées. La microscopie SIM a tendance à générer des artéfacts de reconstruction (valeurs négatives). La microscopie STED est coûteuse et complexe et peut difficilement être adaptée pour l'imagerie multi-couleurs. Les méthodes de microscopie SMLM ne sont pas adaptées à l'imagerie en trois dimensions.

La microscopie ISM permet également d'augmenter la résolution en microscopie optique à balayage (d'un facteur  $\approx 1.6$ ) et utilise souvent des algorithmes de déconvolution. Cependant, la microscopie ISM requiert l'acquisition de douzaines d'images en parallèle pour son étape de traitement d'images alors que la méthode proposée ici ne nécessite que deux images. De plus, les PSF utilisées pour la microscopie ISM restent des PSF gaussiennes ou semblables à des PSF gaussiennes alors que les deux PSF utilisées ici ont été sélectionnées pour leur contenu spectral complémentaire. Grâce à cette complémentarité, nous proposons une méthode atteignant une meilleure résolution par rapport à celle de la microscopie ISM, et ce, sans modification du module de détection du microscopie confocal, qui constitue un élément crucial de la microscopie ISM [222].

La méthode proposée dans ce chapitre ne dépend pas des propriétés spécifiques de certaines molécules fluorescentes. Seul le changement de mode laser sur le chemin optique avant le microscope à balayage laser est nécessaire. La déconvolution est un domaine du traitement d'images bien connu et étudié, et un grand nombre d'algorithmes très performants sont disponibles pour traiter les images de microscopie. Les deux seules limites à cette méthode sont : l'acquisition de deux images, réduisant par deux la résolution temporelle, ainsi que le temps de traitement de la déconvolution. La méthode conserve cependant toutes les possibilités expérimentales de la microscopie confocale, telles que l'imagerie multi-couleurs, avec une étape de traitement effectuée après l'acquisition.

Nous avons démontré ici que l'utilisation de différents faisceaux laser en microscopie permet d'obtenir des PSF avec un contenu plus intéressant et jouant un rôle important dans la qualité du résultat de déconvolution. Nous avons utilisé ce principe pour aider l'algorithme de déconvolution utilisé à obtenir de meilleures images en contrôlant les PSF utilisées.

## Chapitre 3

# Reconstruction 3D à partir de projections par faisceaux Bessel-Gauss en microscopie deux photons

Ce chapitre a pour but de montrer qu'il est possible de retrouver l'information volumétrique à partir d'acquisitions en microscopie deux photons à haute profondeur de champ. Nous avons utilisé un algorithme de tomographie pour récupérer l'information présente dans les images à haute profondeur de champ et reconstruire un volume.

### 3.1 La stéréoscopie : point de départ de l'idée

Le concept de la stéréoscopie est de prendre deux images d'un objet sous différents angles et de pouvoir ensuite observer l'objet « en 3D ». Le but de la stéréoscopie est de redonner au cerveau humain l'impression d'observer un objet réel en lui donnant deux points de vue de l'objet, généralement un pour chaque œil. Cet effet est notamment utilisé dans le cinéma 3D. Le film est tourné avec une caméra spécifique prenant deux points de vue à angles de la scène. Les deux images sont ensuite projetées sur l'écran et il a fallu trouver des moyens pour séparer les deux images pour chaque œil. La plupart des lunettes 3D utilisées aujourd'hui dans le grand public ont des verres polarisés permettant de séparer les deux images présentes sur l'écran pour chaque œil en fonction de la polarisation de la lumière utilisée pour chaque image (gauche ou droite).

L'utilisation des faisceaux Bessel-Gauss en microscopie deux photons a permis d'obtenir des systèmes d'imagerie avec une grande profondeur de champ [174–176] permettant ainsi, par exemple, de garder dans le champ de vue des cellules ou structures lors de mouvements verticaux de l'échantillon. Le problème de cette grande profondeur de champ est que l'information de résolution selon l'axe optique ( $z$ ) est perdue à l'acquisition. Pour remédier à ce problème,

certain auteurs ont proposé de retrouver l'information de profondeur en utilisant la stéréoscopie et deux acquisitions en microscopie deux photons Bessel-Gauss à angles [197,223]. La fig. 3.1 montre un schéma simplifié de la méthode ainsi que quelques images de stéré-microscopie Bessel-Gauss.

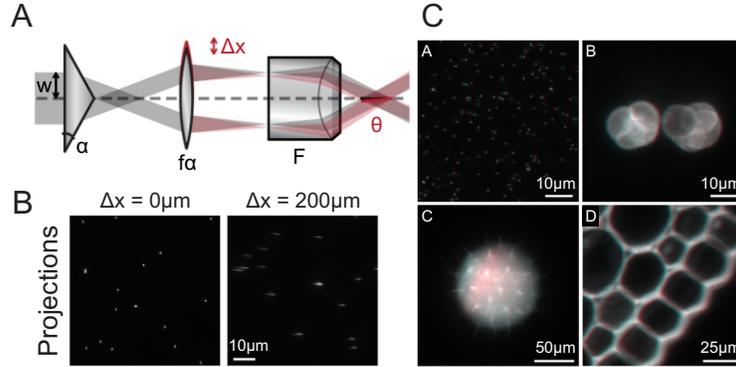


FIGURE 3.1 – *A/* Schéma simplifié du module stéréoscopie d'un microscope deux photons Bessel-Gauss. Un décalage de la lentille liée à l'axicon permet de décaler l'anneau mince formant le faisceau Bessel-Gauss et ainsi d'obtenir un faisceau Bessel-Gauss à angle au niveau de l'échantillon. *B/* Exemples d'images de nano-sphères prises avec un faisceau Bessel-Gauss droit puis à angle. *C/* Exemples de couples d'images stéréoscopiques prises avec deux faisceaux Bessel-Gauss à angle ; l'un en rouge et l'autre en vert. En (a) des nano-sphères, (b) et (c) des grains de pollen et (d) des rhizomes de *Convalaria*. Images modifiées de [197].

D'autres auteurs ont déjà proposé d'utiliser des algorithmes de type stéréo-correspondance pour retrouver cette information [223]. Le problème principal de la stéréo-correspondance est la nécessité d'avoir un a priori très fort sur la forme des structures de l'échantillon pour pouvoir reconstruire le volume correctement.

L'objectif de ce chapitre est de montrer qu'il est possible de reconstruire un volume à partir de projections obtenues en microscopie optique deux photons. Pour obtenir une projection d'un volume en microscopie optique deux photon (avec l'utilisation de molécules fluorescentes comme agents de contraste) l'utilisation de faisceaux Bessel-Gauss est nécessaire si l'on souhaite garder un système de microscopie deux photons classique. Nous cherchons donc à montrer qu'il est possible d'obtenir une série de projections d'un volume à l'aide de la microscopie optique deux photons. Puis, nous montrerons que ces projections peuvent servir à la reconstruction 3D du volume observé à l'aide d'un algorithme de tomographie.

## 3.2 Théorie et méthode de tomographie

Nous proposons ici est de partir avec des algorithmes de tomographie afin de pouvoir reconstruire le volume complet observé. L'étude avait pour but de proposer une méthode permettant d'obtenir une image en trois dimensions avec moins d'acquisitions que si le volume avait été

acquis en microscopie deux photons classique plan par plan, le tout avec la meilleure résolution possible.

### 3.2.1 Définition et histoire

La tomographie est une technique d'imagerie principalement utilisée dans le domaine médical pour de l'imagerie 3D dont le principe de base est la reconstruction d'un volume 3D à partir de projections 2D. Dans le domaine médical on utilise, entre autres, comme outil de projection, les rayons X dans le cas des scanners (CT scan pour computerized tomography scan), les positrons pour l'imagerie PET (Positron Emission Tomography), le rayonnement infrarouge pour la tomographie optique cohérente (OCT : Optical coherence tomography). La tomographie est également utilisée en sismologie, i.e. la tomographie sismique, qui utilise les tremblements de terre pour reconstruire la structure interne de la terre ainsi que ses propriétés physiques.

Les algorithmes de tomographie appartiennent tous au domaine des problèmes inverses (au même titre que la déconvolution) et il en existe un grand nombre différent pour chaque application.

Pour plus de détails sur les méthodes de tomographie et leurs applications voir [224–227].

### 3.2.2 Projection et rétroprojection

Pour mieux saisir les enjeux de la tomographie, il est essentiel de bien comprendre ce qu'est une projection et de bien faire la différence entre projection et coupe. La fig. 3.2-*A* montre, avec un schéma simplifié, la différence entre des coupes, ou sections, d'un volume (S1 et S2) et la projection de ce volume (P), ici selon la direction horizontale. Une section représente ici une partie du volume, un simple plan, alors que la projection est une sommation (intégrale) de la totalité des éléments du volume selon une direction. A la fig. 3.2-*B* sont présentés deux exemples de projections : une première projection d'une image 2D vers une ligne 1D, et une projection d'un volume 3D vers une image 2D. Lorsqu'on parle de projection, il est toujours question de représenter la scène dans un espace de dimension moindre.

En tomographie, il est important de définir un bon modèle de projection. Ce modèle de projection a pour but de décrire au mieux le phénomène d'acquisition d'image. Dans l'imagerie médicale c'est, par exemple, le phénomène d'absorption des rayons X par les différents tissus du corps humain. Le modèle de projection que nous allons utiliser ici est un modèle assez classique : le modèle de la transformée de Radon [228].

La transformée de Radon, ou théorème de projection de Radon, est une transformée intégrale qui définit une série de projections. La transformée de Radon fut proposée pour la première fois par Johann Radon [228]. L'équation suivante définit la transformée intégrale de Radon :

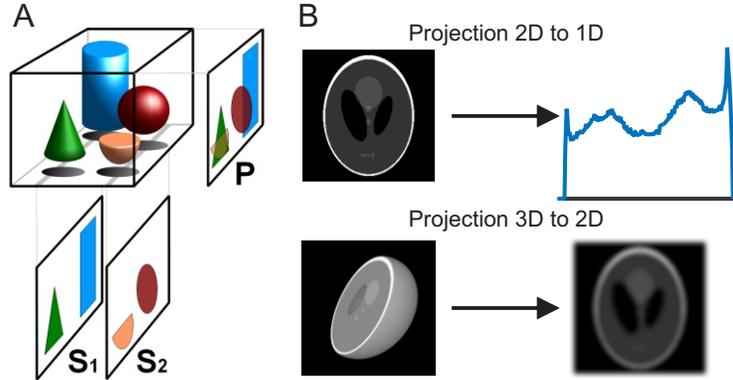


FIGURE 3.2 – *A/* Vue simplifiée des différences entre section ( $S_1$  et  $S_2$ ) et projection ( $P$ ). *B/* Exemples de projections d’un fantôme dit de Shepp-Logan (donnée simulée couramment utilisée en tomographie) d’une image 2D vers une ligne 1D, puis d’un volume 3D vers une image 2D.

$$Rf(L) = \int_L f(x) |dx| \quad (3.1)$$

Rf représente la transformée de Radon, L, l’ensemble des lignes échantillonnant l’espace considéré. Concrètement, la transformée de Radon décrit l’ensemble des projections intégrales selon toutes les directions permettant une projection. Cette équation a initialement été définie pour des projections d’espaces de dimension 2 à des espaces de dimension 1 mais a depuis été généralisée pour des projections d’espaces de dimension N à des espaces de dimension N-1. Les données ainsi obtenues après une transformée de Radon représentent la totalité des projections effectuées de l’espace objet. En pratique, sur des données numériques, l’intégrale est souvent traduite en somme d’éléments finis. Cet ensemble de projections est souvent appelé un sinogramme (fig. 3.3).

La fig. 3.4-A montre, en exemple, une série de projections en une dimension d’une image en deux dimensions. Maintenant que nous avons notre série de projections, il est temps de passer à la reconstruction. Le but est de retrouver notre volume initial uniquement avec les informations contenues dans les projections.

La méthode la plus simple, qui permet une reconstruction tomographique, est la méthode de rétroprojection. Cette méthode consiste à prendre les projections contenues dans le sinogramme et à les propager dans la direction selon laquelle elles ont été projetées pour obtenir un objet de la bonne dimension (2D vers 3D). Ces projections étalées sont ensuite sommées pour obtenir une reconstruction de l’objet. Un exemple de reconstruction par rétroprojection simple est présenté à la fig. 3.4-B.

Cependant, un problème demeure. Lors de l’enregistrement des projections, la couverture

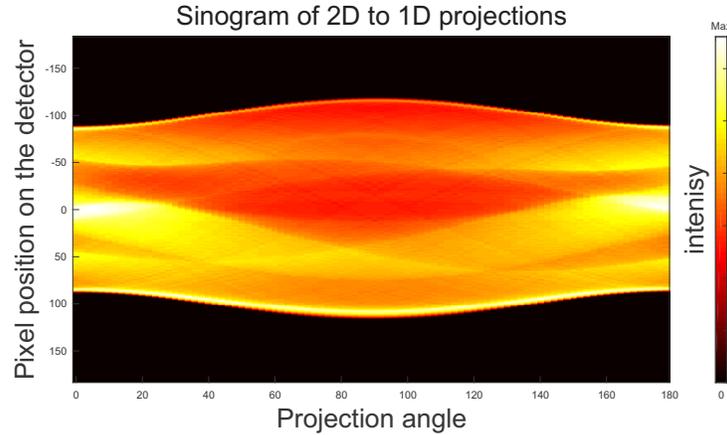


FIGURE 3.3 – Un exemple de sinogramme des projections du fantôme Shepp-Logan 2D. Chaque colonne représente une projection à un angle bien particulier.

fréquentielle est de moins en moins complète à mesure qu'on s'éloigne du centre de l'image. Ce manque d'informations de hautes fréquences va inévitablement dégrader le résultat car la reconstruction agira également comme un filtre passe bas. Ainsi, une grande partie des détails seront perdus. Pour pallier ce problème, l'utilisation de filtres permet d'amplifier les hautes fréquences. Le filtre le plus courant est le filtre rampe de base, bien qu'il ait tendance à amplifier le bruit de haute fréquence. Étant donné la tendance du filtre rampe à amplifier les hautes fréquences, il est souvent combiné à un filtre passe bas (du type Butterworth ou Hanning). Un certain nombre de ces filtres sont étudiés en [224, 229, 230]. Pour tirer profit de ces différents filtres permettant d'améliorer la reconstruction, la méthode de rétroprojection filtrée est utilisée.

La méthode classique de rétroprojection filtrée utilise des filtres pour pré-filtrer chacune des projections du sinogramme avant de procéder à la rétroprojection. Cette étape de pré-filtrage permet d'amplifier certains contenus en hautes fréquences des projections pour compenser le manque de couverture fréquentielle. La fig. 3.4-B montre un exemple de rétroprojection filtrée comparé à un exemple de rétroprojection simple sur la reconstruction d'une image en deux dimensions.

### 3.2.3 Les faisceaux Bessel-Gauss comme moyen de projection

Dans cette section, nous allons présenter le modèle de projection que nous allons utiliser. Il est basé sur l'utilisation des faisceaux Bessel-Gauss en microscopie de fluorescence deux photons à balayage laser.

En microscopie confocale, le sectionnement optique est donné par le sténopé du microscope (comme présenté en section 0.1.5). La microscopie deux photons utilise l'effet deux photons pour obtenir un sectionnement optique identique à la microscopie confocale. La microscopie

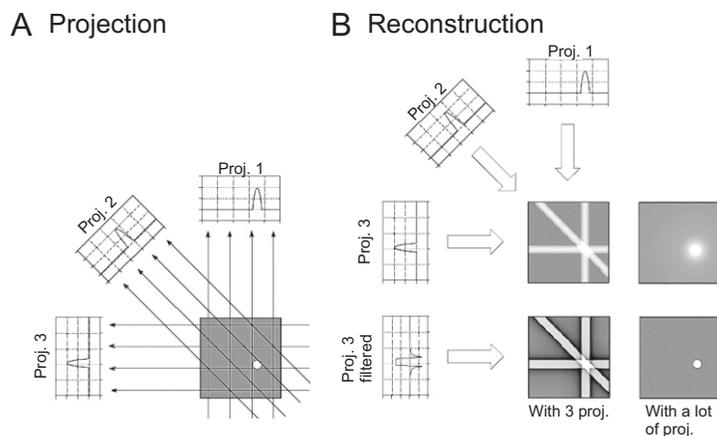


FIGURE 3.4 – *A/* Exemple de projection d’un objet en deux dimensions donnant des vecteurs en une dimension. *B/* Reconstruction par rétroprojection simple comparée à une reconstruction par rétroprojection filtrée à l’aide d’un filtre rampe. On remarque que, non seulement un grand nombre de projections est nécessaire pour reconstruire correctement l’objet, mais en plus le filtrage est nécessaire pour éliminer le flou de la reconstruction. Figures adaptées de [231]

deux photons est basée sur l’effet d’absorption multiphotonique (deux photons dans ce cas).

Comme présenté en [197], nous proposons d’utiliser des faisceaux Bessel-Gauss proposant une profondeur de champ étendue en microscopie deux photons comme moyen de projection. Ces faisceaux Bessel-Gauss permettent d’obtenir sur une image, l’intégration du volume selon la direction de focalisation du faisceau Bessel-Gauss. Étant donné la possibilité de générer des faisceaux Bessel-Gauss focalisés avec un angle, un certain nombre de projections pourront être acquises successivement pour construire notre sinogramme.

La fig. 3.5 montre en exemple un faisceau Bessel-Gauss à angle. Le faisceau Bessel-Gauss va exciter les molécules fluorescentes de l’échantillon sur toute sa longueur. On se retrouve ainsi à intégrer toute la fluorescence provenant de la ligne du faisceau Bessel-Gauss en un point. Le balayage laser permet de construire une image en deux dimensions représentant une projection du volume observée selon la direction de focalisation du faisceau Bessel-Gauss.

Maintenant que nous savons qu’il est possible de créer des faisceaux Bessel-Gauss à angle et d’obtenir ainsi une projection de l’échantillon selon l’axe de focalisation du faisceau Bessel-Gauss en microscopie deux photons, nous devons définir des angles de projection réalistes. Ces angles de projection sont définis en fonction de l’ouverture numérique de l’objectif du microscope. Cette ouverture numérique nous donne une limite quant à l’angle maximal avec lequel on pourrait focaliser un faisceau Bessel-Gauss. La fig. 3.6-*A* montre l’angle de focalisation maximal du faisceau Bessel-Gauss et à la fig. 3.6-*B* nous montrons l’échantillonnage des angles que nous proposons d’utiliser pour nos projections. Nous avons choisi d’utiliser une vingtaine d’angles de projection répartis azimutalement sur deux cercles concentriques repré-

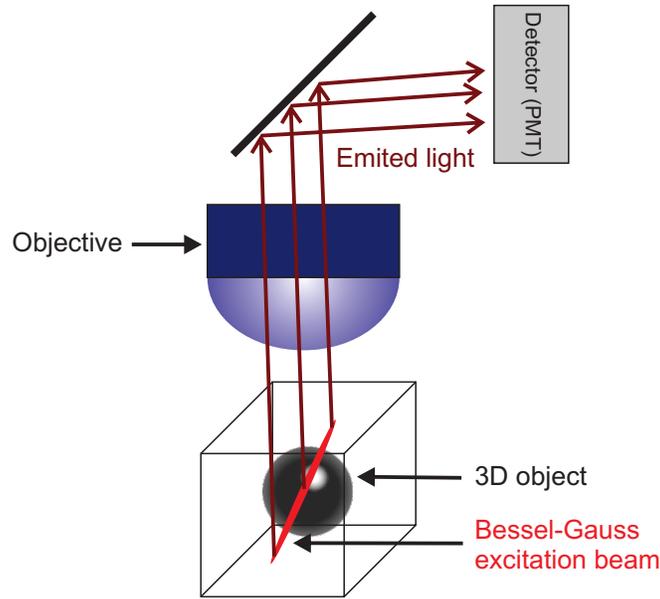


FIGURE 3.5 – Schéma montrant le faisceau Bessel-Gauss en tant que moyen de projection. La totalité de la fluorescence émise dans la zone focale étendue du faisceau Bessel-Gauss est intégrée par le détecteur.

sentant deux angles radiaux différents (l'angle maximal défini par l'ouverture numérique et sa moitié).

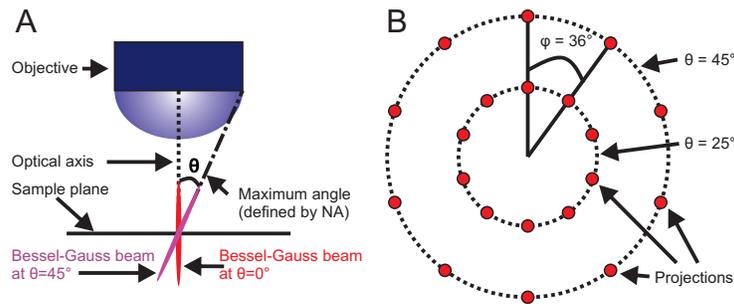


FIGURE 3.6 – *A/* Exemple de faisceaux Bessel-Gauss focalisés droit et à l'angle maximal autorisé par l'ouverture numérique ( $NA = 1.2$ ). *B/* Représentation des angles de focalisation proposés pour profiter au maximum de l'ouverture numérique tout en minimisant le nombre de projections.

En plus du flou ajouté à la reconstruction par le manque de couverture fréquentielle, le faisceau Bessel-Gauss lui-même ajoute un flou à chacune des projections. En effet, lors de l'acquisition d'une projection, chaque plan du volume projeté est convolué par la PSF transversale du faisceau Bessel-Gauss. De plus, étant donné que le faisceau Bessel-Gauss a un profil gaussien selon l'axe optique (dans la longueur du faisceau Bessel-Gauss), la projection n'est pas tota-

lement uniforme. Les éléments fluorescents dans le plan central seront excités par la partie du faisceau Bessel-Gauss la plus intense, alors que ceux éloignés du plan central seront excités par la partie la moins intense du faisceau Bessel-Gauss. La fig. 3.7 représente une simulation de la PSF du faisceau Bessel-Gauss en microscopie deux photons. Pour construire cette estimation de la PSF, nous avons simplement étalé la PSF présentée en section 1.2.1 en trois dimensions suivant un profil gaussien. La coupe transversale de la PSF donne un profil suivant une fonction de Bessel au carré et la coupe sagittale à un profil gaussien.

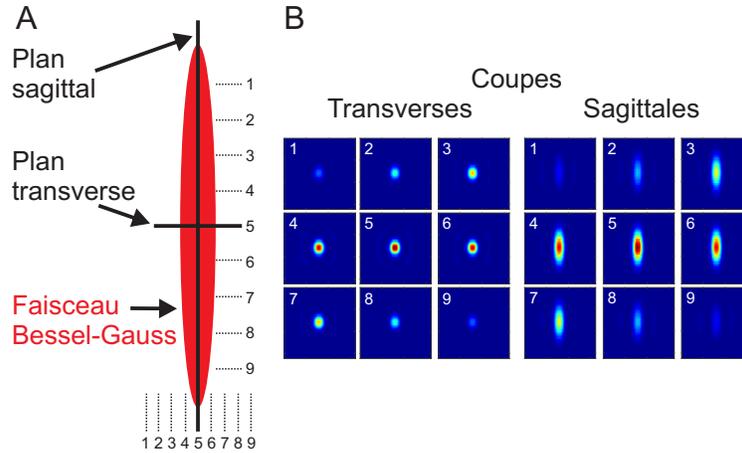


FIGURE 3.7 – *A/* Représentation schématique du faisceau Bessel-Gauss focalisé ainsi que les plans de coupe utilisés en *B/*. *B/* Coupes transversales et sagittales de la PSF simulée du faisceau Bessel-Gauss.

Étant donné que les projections ont subi une convolution par une PSF du type du faisceau Bessel-Gauss présentée en section 1.2.1, nous proposons de déconvoluer les projections avant de procéder à la reconstruction. Pour cela, nous allons dans un premier temps utiliser le filtre de Wiener (éq. (2.2)) comme filtre déconvolutif, et nous allons le combiner au filtre rampe. Le but est de remplacer le filtre passe bas, souvent combiné au filtre rampe, par le filtre de Wiener. Ce filtre déconvolutif permet d'inverser la convolution des projections avec la PSF du faisceau Bessel-Gauss.

### 3.3 Caractérisation de l'algorithme et simulations

Pour caractériser la reconstruction et pouvoir estimer la faisabilité de cette méthode d'imagerie, nous avons dans un premier temps testé plusieurs reconstructions de rétroprojections sur un modèle simulé de Shepp-Logan en trois dimensions. La fig. 3.8-A montre une coupe du Shepp-Logan 3D simulé ainsi qu'une coupe du faisceau Bessel-Gauss, considérée comme la PSF des projections. Le modèle de Shepp-Logan 3D et celui du faisceau Bessel-Gauss font tous deux  $512 \times 512 \times 256$  pixels. Le faisceau Bessel-Gauss a une largeur à mi-hauteur de 14 pixels. La fig. 3.8-B montre les 20 projections obtenues en suivant les angles définis à la fig. 3.6. Comme on peut le remarquer, chacune des projections est rendue floue, non seulement par l'opération

de projection elle-même mais également par la PSF du faisceau Bessel-Gauss. Dans les figures 3.8-(B), les projections sont représentées sans bruit. Le bruit est ajouté ensuite pour simuler l'acquisition par un microscope. Le bruit ajouté est un bruit gaussien de moyenne 0.002 et de variance 0.005 en utilisant la fonction *imnoise* de Matlab.

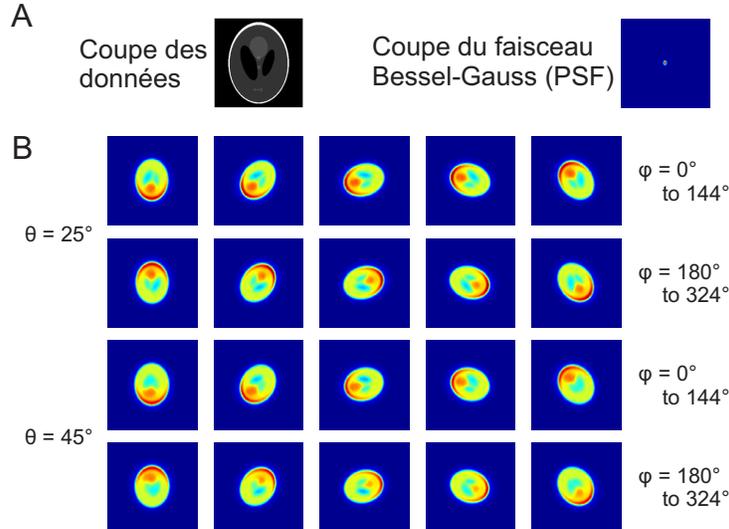


FIGURE 3.8 – Simulation des projections avec faisceaux Bessel-Gauss. *A/* Image d'une coupe du Shepp-Logan 3D ainsi qu'une coupe de la PSF du faisceau Bessel-Gauss. *B/* Projections du Shepp-Logan 3D obtenues avec le faisceau Bessel-Gauss simulé. Les angles listés sont représentés à la fig. 3.6.

La fig. 3.9 montre plusieurs résultats de reconstruction par rétroprojections. La première ligne compare une coupe de l'objet original avec une projection, puis une coupe d'une rétroprojection simple, sans filtre. La rétroprojection simple permet de reconstruire l'objet, mais le résultat reste fortement dégradé. La seconde ligne montre trois exemples de coupes de reconstruction par rétroprojection filtrée utilisant différents filtres. Le premier est un filtre rampe qui amplifie les haute fréquences, dans le but de combler le manque de couverture fréquentielle. On remarque cependant que, dans le cas de projections bruitées, le filtre rampe a tendance à trop amplifier certaines fréquences et à amplifier le bruit, ce qui donne une reconstruction fortement dégradée. C'est pour cela que le filtre rampe est souvent combiné à un autre filtre, un filtre passe bas tel que le filtre Butterworth.

Le filtre Butterworth est un filtre passe bas dont l'équation est :

$$B(u) = \frac{1}{1 + \left(\frac{u}{u_c}\right)^{2n}} \quad (3.2)$$

avec  $u$  la fréquence spatiale,  $u_c$  la fréquence de coupure du filtre, et  $n$  l'ordre du filtre. La fréquence de coupure est sélectionnée pour minimiser le bruit dans la reconstruction finale et l'ordre donne la force de la coupure des fréquences au-delà de la fréquence de coupure, ceci

permettant de filtrer le bruit tout en gardant un certain détail de l'objet reconstruit. Dans la fig. 3.9, le filtre Butterworth a une fréquence de coupure réduite de 0.025 et un ordre de 3.

La coupe de la rétroprojection effectuée avec une combinaison des filtres rampe et Butterworth donne un résultat plus détaillé et proche de l'objet réel qu'une simple rétroprojection. Pour la dernière coupe de reconstruction présentée, le filtre Butterworth est remplacé par un filtre de Wiener pour contrer plus efficacement le fait que chaque projection acquise est en plus convoluée avec la PSF du faisceau Bessel-Gauss. En observant la coupe de la rétroprojection utilisant une combinaison des filtres rampes et de Wiener, on remarque que le résultat n'est pas si différent du résultat précédant utilisant la combinaison de filtres rampes et Butterworth. Cela peut s'expliquer par le fait que les deux filtres ont des expressions similaires et que la différence apportée par la prise en compte de la PSF du faisceau Bessel-Gauss n'est pas suffisante pour différencier les deux filtres. Pour améliorer les résultats obtenus ici, il faudrait changer de méthode de reconstruction en tomographie et remplacer le filtre de Wiener pour une méthode de déconvolution plus efficace. Cette proposition sera détaillée dans la dernière section de ce chapitre.

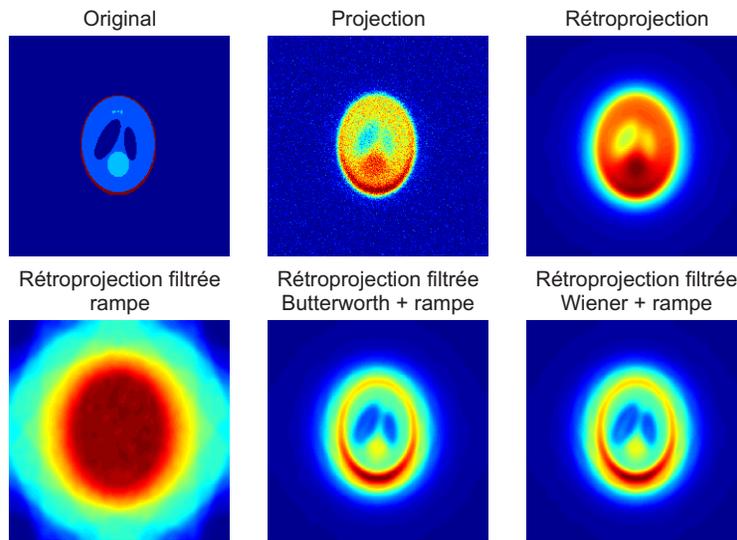


FIGURE 3.9 – Résultats de reconstruction par rétroprojection et rétroprojection filtrée. La ligne du haut montre dans l'ordre de *gauche* à *droite* : une coupe de l'image originale, une projection de l'image originale, une coupe de l'image obtenue par rétroprojection simple. La ligne du bas montre des coupes de l'image reconstruite par rétroprojection filtrée. Dans l'ordre de *gauche* à *droite* nous voyons : l'image avec le filtre rampe seul, l'image avec le filtre rampe combiné au filtre Butterworth et l'image avec le filtre rampe combiné au filtre de Wiener.

Dans la section suivante nous allons décrire une méthode expérimentale permettant d'obtenir des projections compatibles avec la reconstruction tomographique présentée ici.

### 3.4 Application expérimentale

Pour obtenir expérimentalement des projections à angles avec des faisceaux Bessel-Gauss, la méthode présentée en [197] sera utilisée. L'objectif est d'utiliser la lentille de relais située juste après l'axicon dans le parcours optique pour induire un décalage de l'anneau mince formé. Ce dernier se traduira par un faisceau Bessel-Gauss focalisé à angle par l'objectif. Pour permettre une mesure précise des angles de focalisation du faisceau Bessel-Gauss ainsi qu'une reproductibilité expérimentale, il faudrait remplacer la monture de cette lentille par une monture motorisée de grande précision. Un exemple du montage est présenté à la fig. 3.10.

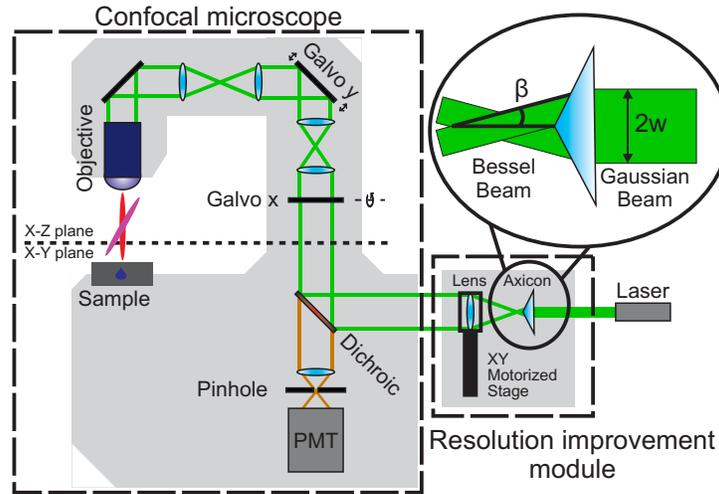


FIGURE 3.10 – Schéma simplifié représentant le microscope confocal avec la transformation du faisceau gaussien en faisceau Bessel-Gauss. La partie grossie permet d'insister sur la transformation effectuée par l'axicon. Dans cette partie,  $w$  représente la taille du faisceau gaussien entrant dans l'axicon et  $\beta$  l'angle du cône formé par les rayons réfractés par l'axicon. Le laser utilisé est un Compass 215M (avec une longueur d'onde de 532 nm) délivrant une puissance maximale de 40 mW, ce qui est largement suffisant pour notre application. La monture motorisée permet de déplacer la lentille avec précision et de pouvoir obtenir ainsi une reproductibilité des angles de projection.

Une étape de calibration et de mesure des angles de focalisation du faisceau Bessel-Gauss (en utilisant des échantillons de nano-sphères fluorescentes) sera nécessaire avant toute mesure et tentative de reconstruction.

### 3.5 Discussion

Comme mentionné en section 3.3, l'utilisation du filtre de Wiener ne permet pas de montrer une amélioration nette par rapport à l'utilisation d'un filtre Butterworth pour la rétroprojection. Si l'on compare le spectre des filtres de Wiener et Butterworth (selon la direction horizontale), on remarque une nette différence (voir fig. 3.11). Le filtre de Wiener possède

une zone d'amplification en basses / moyennes fréquences alors que le filtre Butterworth n'est qu'un filtre passe bas. Cependant, lorsqu'on regarde la combinaison entre les filtres de Wiener et Butterworth avec un filtre rampe, les deux filtres ainsi générés se ressemblent fortement. Ils sont tous deux des filtres passe bande en fréquences moyennes. Étant donné que pour la rétroprojection les filtres de Wiener et Butterworth sont combinés avec le filtre rampe, cela explique le manque de différences entre les rétroprojections utilisant les deux filtres présentées à la fig. 3.9.

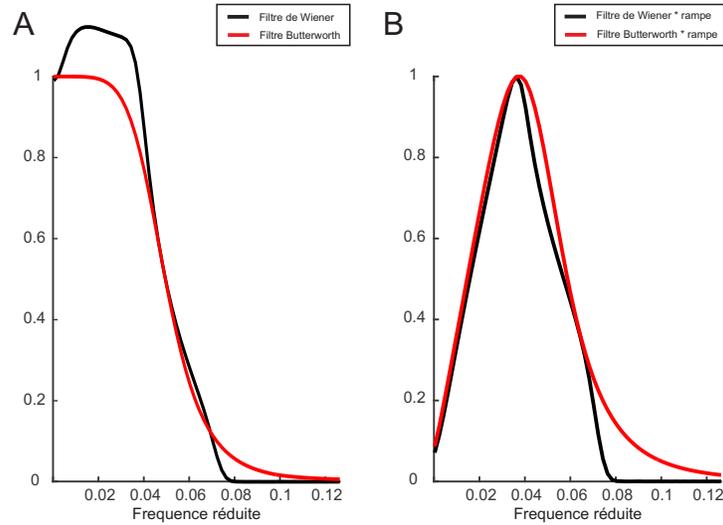


FIGURE 3.11 – Profils latéraux des différents filtres utilisés pour la rétroprojection filtrée. *A/* Les filtres de Wiener et Butterworth sont comparés. *B/* Les filtres de Wiener et Butterworth sont chacun combinés à un filtre rampe avant d’être comparés.

Pour une meilleure reconstruction, le filtre de Wiener n’est pas suffisant en tant que filtre déconvolutif. Il faudrait déconvoluer les projections avec un algorithme de déconvolution plus efficace puis procéder à une reconstruction tomographique moins sensible au bruit et au manque de couverture angulaire que la rétroprojection.

Il est également important de noter que l’utilisation des faisceaux Bessel-Gauss est une nécessité pour obtenir une projection en microscopie deux photons. En effet les faisceaux Bessel-Gauss sont les seuls à proposer une profondeur de champ augmentée avec un profil uniforme sur la totalité de la profondeur. Cet attribut des faisceaux Bessel-Gauss leur permet de servir de projecteur en microscopie deux photons et offre ainsi la possibilité d’obtenir des projections linéaires dans la direction de focalisation du faisceau Bessel-Gauss.

La question qui reste en suspens est : Combien d’acquisitions sont nécessaires pour reconstruire une image volumétrique ayant une résolution comparable à la microscopie deux photons classique ? L’étude présentée ici utilise une vingtaine de projections pour la reconstruction tomographique mais il est possible qu’un algorithme plus performant que la rétroprojection filtrée en nécessite moins.

La méthode proposée permet de reconstruire un volume aussi grand que la longueur du faisceau Bessel-Gauss. Plus le faisceau Bessel-Gauss est long, plus le volume reconstruit pourra être grand. L'objectif final serait de pouvoir reconstruire un très grand volume avec un nombre d'acquisitions limité, ou du moins significativement plus faible que celui nécessaire à une acquisition plan par plan. Dans le cas de la rétroprojection cet objectif paraît extrêmement difficile mais il resterait à tester avec un algorithme de tomographie plus performant.

Une contrainte majeure liée à la reconstruction 3D de grands volumes est le temps de traitement nécessaire pour la reconstruction. La rétroprojection filtrée prend déjà plusieurs heures (avec un algorithme simple programmé en Matlab), un algorithme plus performant pourrait demander beaucoup plus de ressources et de temps de calcul. Cette étape reste cependant une étape de reconstruction effectuée après la phase d'acquisition, ce qui permettrait d'observer des phénomènes biologiques (dynamiques ou non) puis de prendre le temps de reconstruire les images pour l'analyse.

### 3.6 Ouverture et directions futures

Il existe un grand nombre de méthodes dédiées à la reconstruction tomographique. La rétroprojection est une méthode particulièrement simple et rapide à mettre en œuvre mais ne fait pas partie des plus performantes. Pour améliorer la reconstruction, il serait intéressant de passer vers un algorithme plus poussé tel que l'algorithme ML-EM (Maximum Likelihood – Expectation Maximisation) [232–238]. Cet algorithme permettrait une meilleure reconstruction tomographique notamment dans le cas où le nombre d'angles est faible et où les projections peuvent être bruitées.

De plus, il serait également pertinent de remplacer l'étape de pré-traitement des projections, à savoir le filtre de déconvolution de Wiener, par un algorithme de déconvolution plus efficace et moins sensible au bruit. Comme pour les algorithmes de tomographie, le choix des algorithmes de déconvolution est grand. Nous proposons ici de passer à un algorithme du type Richardson-Lucy qui peut potentiellement être régularisé pour devenir un algorithme convergent [239–244].

Ce chapitre a permis de démontrer qu'une reconstruction 3D à partir de projections obtenues à l'aide de microscopie deux photons utilisant les faisceaux Bessel-Gauss est possible. Il reste à déterminer expérimentalement quel algorithme permettrait la meilleure reconstruction et si un tel algorithme permettrait de réduire suffisamment le nombre de projections nécessaires pour permettre une acquisition d'un volume plus rapidement que dans le cas d'une acquisition plan par plan.

# Discussion

Dans ce document, nous avons proposé plusieurs méthodes pour augmenter la résolution en microscopie confocale tout en conservant au maximum ses avantages. D'un point de vue expérimental, les méthodes proposées ne changent pas la structure du microscope, mais nécessitant simplement un changement du faisceau laser utilisé pour le balayage de l'échantillon. L'objectif suivi tout au long de cette thèse était de garder le système d'acquisition le plus proche possible d'un système classique commercial pour permettre à ces méthodes d'être utilisées le plus facilement possible.

La première méthode proposée, à savoir l'utilisation des faisceaux Bessel-Gauss d'ordre 0 en microscopie confocale, permet d'obtenir une augmentation de la résolution du microscope confocal d'au moins 20%. L'utilisation de cette méthode ne nécessite aucun post-traitement et l'image est obtenue directement. Le design expérimental n'est constitué que d'éléments optiques passifs (lentille et axicon), ce qui permet une intégration rapide et durable dans un système confocal, commercial ou non.

La contrainte principale est l'alignement de ces éléments optiques dans le microscope confocal. Cet alignement doit être effectué avec la plus grande précision pour permettre une optimisation des résultats. Comme nous l'avons vu au chapitre 2, un mauvais alignement soit de l'axicon et de la lentille soit du sténopé se traduit rapidement par un faisceau Bessel-Gauss non optimal. Cet alignement non optimal peut se traduire par un faisceau plus large et donc une perte de résolution ou encore par des lobes secondaires qui ne sont pas filtrés par le sténopé.

Un inconvénient mineur est la perte de puissance dans les lobes secondaires et la grande profondeur de champ du faisceau Bessel-Gauss, qui se traduit soit par une augmentation du photoblanchiment, soit par une diminution du rapport signal à bruit. Un réglage des dimensions du faisceau gaussien à l'entrée de l'axicon, permettant de générer un faisceau Bessel-Gauss le plus court possible, limite ainsi la perte de puissance due à l'augmentation de profondeur de champ et réduit le photoblanchiment.

Dans un second temps, un faisceau Bessel-Gauss d'ordre 1 peut être généré avec les mêmes éléments optiques que ceux qui sont utilisés pour le faisceau Bessel-Gauss d'ordre 0. Pour cela, il est nécessaire de changer la polarisation du faisceau gaussien à l'entrée de l'axicon pour une

polarisation azimutale. Le changement de polarisation du faisceau laser peut être effectué par un module qui serait installé sur le chemin optique avant l'entrée du microscope et avant le module comportant l'axicon. Dans notre cas, ce module est constitué d'un élément optique actif permettant d'obtenir une polarisation azimutale.

Le fait de pouvoir obtenir des faisceaux Bessel-Gauss d'ordres 0 et 1 a permis d'améliorer la méthode SLAM pour obtenir la méthode B-SLAM et ainsi gagner un facteur 2.5 sur la résolution du microscope confocal. La méthode B-SLAM nécessite un post-traitement des images pour être fonctionnelle. Étant donné que ce post-traitement est une simple soustraction, il serait possible d'automatiser le processus aisément. De la même manière, le module permettant de changer l'ordre du faisceau Bessel-Gauss pourrait être également automatisé. Cette méthode permettrait d'avoir un système complètement automatique sans changer fondamentalement le fonctionnement du microscope qui resterait un microscope confocal classique.

Un avantage majeur quant à l'utilisation des faisceaux Bessel-Gauss est leur capacité d'auto-reconstruction, ce qui en fait des faisceaux de choix pour l'imagerie biomédicale. En effet, cette capacité d'auto-reconstruction permet aux faisceaux Bessel-Gauss de garder leur profil même lorsque leur propagation ou focalisation est perturbée par un ou plusieurs éléments bloquants [170, 171]. Le fait d'utiliser des faisceaux possédant ce type de comportement est un atout en microscopie optique puisque, dans le cas d'observation de structures biologiques, les inhomogénéités d'indice de réfraction de l'échantillon sont souvent source de dégradations du faisceau d'excitation. Dans le cas des faisceaux Bessel-Gauss, ces dégradations sont réduites grâce à leurs capacités d'auto-reconstruction.

En ce qui concerne la création de faisceaux Bessel-Gauss, la qualité de l'axicon utilisé fait toute la différence. Bien que l'axicon soit un élément optique passif, les défis de fabrication font qu'il est difficile de trouver des axicons de qualité suffisante pour de l'imagerie de haute résolution. L'annexe B présente une étude de qualité effectuée sur six axicons pour l'entreprise BliQ. Nous proposons d'utiliser les protocoles développés durant cette étude comme standard et les images comme tables de comparaisons lorsqu'il s'agit de tester la qualité d'un axicon. En effet avec un axicon ayant une pointe défectueuse, il est difficile, voire impossible, d'obtenir un anneau mince correct, ce qui se traduit par un faisceau Bessel-Gauss de faible qualité. Bien qu'il reste possible d'obtenir une image correcte avec un faisceau Bessel-Gauss non optimal, la qualité de cette image sera moindre et la résolution obtenue ne sera certainement pas celle escomptée.

Les faisceaux Bessel-Gauss constituent une famille de faisceaux optimaux pour la microscopie confocale. Étant donné qu'ils sont construits à partir d'un anneau mince au niveau de l'ouverture arrière de l'objectif, ils ne sont composés que de hautes fréquences puisque l'objectif agit comme une lentille et applique une transformée de Fourier à cet anneau mince. Ils ne sont donc composés que de rayons bénéficiant du maximum de l'ouverture numérique de l'objec-

tif. Ces faisceaux permettent donc d'obtenir le maximum d'un microscope pour un objectif d'ouverture numérique donnée, entraînant la meilleure résolution possible pour la microscopie confocale. En effet, si l'on imagine tout autre faisceau laser qui serait utilisé en microscopie confocale, ce faisceau restera focalisé par un objectif d'ouverture numérique donnée. Et comme les faisceaux Bessel-Gauss utilisent déjà le maximum de l'ouverture numérique disponible, ce faisceau laser ne pourra pas être construit avec un contenu fréquentiel plus élevé, et donc ne pourra pas proposer une meilleure résolution.

L'utilisation des faisceaux Bessel-Gauss en microscopie confocale est donc la méthode la plus optimale possible lorsqu'il s'agit d'obtenir la meilleure résolution possible tout en conservant un microscope confocal de base.

La seconde méthode proposée tire profit du contenu fréquentiel des différentes PSF utilisées lors de l'acquisition d'images en microscopie confocale. Elle utilise des méthodes de déconvolution pour traiter les images et obtenir ainsi des images de meilleure résolution. Pour cette méthode, le design expérimental est identique à celui proposé pour les méthodes SLAM et B-SLAM, seul le traitement des images est différent. La déconvolution est une méthode de traitement d'images plus adaptée que la soustraction proposée par les méthodes SLAM et B-SLAM. En effet, contrairement à la méthode de déconvolution proposée, la soustraction génère souvent des valeurs négatives qui n'ont aucun sens physique.

Bien que le post-traitement soit ici plus complexe, les modalités d'acquisition des images restent identiques à celles de la microscopie confocale classique (comme avec la méthode B-SLAM). Dans cette méthode, l'algorithme de déconvolution prend avantage du contenu fréquentiel différent des deux PSF pour reconstruire une image avec la meilleure résolution possible. Ce qui est démontré ici est valide quel que soit l'algorithme de déconvolution choisi, à condition qu'il permette de prendre en compte deux images prises avec deux PSF différentes. L'algorithme proposé ici ne dispose pas de méthode adaptée au problème pour régler automatiquement les paramètres de déconvolution. Cependant, de nouveaux algorithmes de déconvolution sont créés chaque année. Ainsi, il sera possible de remplacer l'algorithme de déconvolution lorsqu'un algorithme plus performant et automatique sera disponible.

Concernant la déconvolution, une étape de prétraitement peut être nécessaire. Dans le cas où le signal de fond est trop important, une étape de soustraction de l'arrière-plan doit être effectuée avant la déconvolution. Cette étape de prétraitement permet de retirer ce signal d'arrière-plan, qui est un signal qui n'a pas été convolué par la PSF de l'instrument. Les algorithmes de déconvolution ne savent pas traiter ce signal d'arrière-plan puisqu'ils ne prennent généralement pas en compte la possibilité que l'image soit composée de plusieurs signaux ayant des PSF différentes. Dans le cas de la microscopie optique, et d'autant plus avec l'utilisation de la fluorescence, le signal détecté est composé dans sa quasi-totalité du signal convolué par la PSF de l'instrument, cette étape de soustraction d'arrière-plan est donc rarement nécessaire.

Dans le cas où l'image serait dégradée par un signal d'arrière-plan, il est nécessaire de mesurer ce signal d'arrière-plan pour pouvoir le soustraire à l'image. Si la mesure de ce signal d'arrière-plan n'est pas possible, comme dans le cas où une image en microscopie confocale serait dégradée par un signal hors foyer trop important, une méthode du type « Rolling ball » peut être utilisée pour soustraire le signal d'arrière-plan, à condition que la « balle » soit de taille suffisante, c'est-à-dire bien plus large que la PSF de l'instrument. En microscopie confocale ce cas est rare puisque, pour avoir un signal d'arrière-plan constitué d'un signal hors foyer, il faudrait, soit que le sténopé soit trop large, soit que l'image soit prise avec un grossissement suffisamment fort pour que la PSF ne puisse plus être considérée comme de la même taille sur la totalité de la profondeur de champ du microscope confocal. En effet, lorsqu'une image confocale est prise à fort grossissement, les différences entre la PSF au plan focal et les PSF des plans se situant au-dessus et au-dessous (non filtrées par le sténopé) sont suffisantes pour que l'algorithme de déconvolution considère ces PSF comme différentes. L'algorithme a donc plus de difficulté à déconvoluer l'image correctement. Dans la majorité des cas de déconvolution en microscopie optique ce problème ne se pose pas car, soit la déconvolution est effectuée sur une image 3D, soit les PSF en microscopie confocale sont suffisamment petites (quelques pixels de large) pour que les différences entre les différents plans ne soient pas visibles. Dans notre étude, nous avons pris des PSF larges (ayant un support de 10 à 40 pixels) ce qui fait que la différence est, dans certains cas, notable.

Comme nous l'avons montré, les faisceaux Bessel-Gauss sont les faisceaux qui ont le plus grand contenu hautes fréquences en microscopie à balayage laser. Et comme, pour la déconvolution, plus la PSF contient de hautes fréquences meilleurs seront les résultats de la déconvolution ; les faisceaux Bessel-Gauss sont les faisceaux optimaux pour la déconvolution en microscopie confocale. Cependant, il pourrait être intéressant d'améliorer l'algorithme de déconvolution pour un traitement plus poussé. L'utilisation d'un algorithme de déconvolution myope ou aveugle permettrait de corriger les imperfections présentes dans la PSF mesurée en parallèle des aérations de l'image, ce qui permettrait une meilleure reconstruction. Il est également possible d'utiliser des algorithmes de déconvolution qui permettent de supposer une non-invariance de la PSF dans le champ de vue. Ces algorithmes permettent de considérer que la PSF n'est pas la même en tout point de l'échantillon, permettant par exemple de corriger des aberrations sphériques ou distorsions dues à l'échantillon observé.

Les deux méthodes proposées au chapitre 1 et 2 offrent des alternatives simples et peu onéreuses aux méthodes de superrésolution classiques. La microscopie confocale étant très répandue, des solutions, telles que celles qui sont présentées dans ce manuscrit, proposant une amélioration de la résolution pour ce type de microscopie de 20% ou même d'un facteur 2.5 sont des solutions très intéressantes. De plus, bien que les méthodes de superrésolution classiques (STED, PALM, STORM, ...) proposent des résolutions bien supérieures, il n'est pas toujours nécessaire de descendre à de telles résolutions pour obtenir un résultat biologiquement pertinent. Dans un

grand nombre de cas d'imagerie, une résolution de 10 nm pourrait être considérée comme « overkill » surtout lorsque les méthodes proposées imposent des restrictions quant au choix de la molécule fluorescente ou du type d'échantillon observable. Les méthodes proposées ici permettent donc d'ajouter à l'éventail des méthodes de superrésolution des solutions simples et adaptables sur des systèmes commerciaux existants permettant d'améliorer la résolution, sans faire de compromis trop important.

Le troisième chapitre est davantage un chapitre d'ouverture proposant une autre utilisation des faisceaux Bessel-Gauss, en microscopie deux photons à balayage laser. Le faisceau Bessel-Gauss d'ordre 0 est utilisé pour obtenir des images de microscopie deux photons à profondeur de champ étendue. L'inconvénient de la microscopie deux photons à profondeur de champ étendue est la perte de la résolution axiale. Il est montré ici qu'il est possible de retrouver, du moins en partie, l'information en trois dimensions à partir de projections de l'échantillon obtenues avec les faisceaux Bessel-Gauss à angles. Cette information en trois dimensions permet de redonner une résolution axiale à une image de microscopie deux photons à profondeur de champ étendue. Une projection correspond ici à une image de microscopie deux photons à haute profondeur de champ prise avec un faisceau Bessel-Gauss. Cette méthode nécessite l'acquisition d'un certain nombre de projections. Le but est de ne garder que les projections réalisables avec un objectif fixe ce qui permettrait d'utiliser la méthode pour de l'imagerie in-vivo. L'étude menée ici reste théorique, mais montre cependant les possibilités de la méthode. L'enjeu majeur serait d'obtenir une résolution au moins équivalente à la microscopie deux photons classique permettant l'obtention d'une image en trois dimensions à l'aide d'acquisitions plan par plan.

De plus, les propriétés d'auto-reconstruction des faisceaux Bessel-Gauss les rendent moins sensibles à la diffusion et aux potentiels obstacles sur le trajet du faisceau. Ces faisceaux sont donc très intéressants pour l'imagerie en profondeur dans des tissus vivants, ce qui est un atout particulier pour l'acquisition de grand volume comme proposé dans ce chapitre.

# Conclusion

Pour conclure, nous avons proposé ici un certain nombre de méthodes de microscopie optique dans le but d'augmenter le nombre de modalités d'imagerie possibles dans le domaine biomédical, et permettre ainsi un plus grand choix de méthodes aux utilisateurs potentiels.

La première méthode proposée est l'utilisation des faisceaux Bessel-Gauss d'ordre 0 en microscopie confocale pour gagner 20% de résolution, selon le critère de Rayleigh. Cette méthode permet de rester en microscopie confocale et d'en garder tous les avantages. De plus, en utilisant les mêmes éléments optiques, il est possible de générer des faisceaux Bessel-Gauss d'ordre 1. Cette technique permet de combiner l'utilisation des faisceaux Bessel-Gauss en microscopie confocale avec la méthode SLAM pour obtenir la méthode B-SLAM permettant une augmentation de résolution d'un facteur 2.5 que la microscopie confocale seule ne permet pas. Encore une fois, cette méthode est basée sur la microscopie confocale. Bien que deux images soient nécessaires pour obtenir le gain en résolution, tous les avantages de la microscopie confocale sont conservés. Le traitement d'images des méthodes SLAM et B-SLAM est une simple soustraction qui peut être automatisée facilement. Ce traitement ne complexifie pas significativement la modalité d'imagerie. La microscopie confocale utilisant les faisceaux Bessel-Gauss et la microscopie B-SLAM proposent donc des modalités d'imagerie intéressante pour compléter le spectre des méthodes de superrésolution, à savoir une amélioration de la résolution sans compromis majeur sur le type d'échantillon observable.

La seconde méthode présentée dans ce document utilise la déconvolution comme traitement d'images avec les images de la microscopie SLAM comme point de départ. La déconvolution est une méthode de traitement d'images permettant de gagner en résolution efficacement et plus juste mathématiquement que la soustraction proposée précédemment. L'avantage dans l'utilisation des images de la microscopie SLAM ou B-SLAM en déconvolution est que le contenu fréquentiel des PSF d'imagerie diffère entre les faisceaux brillants et beignes (sombres). De cette manière, la déconvolution peut reconstruire plus de contenus de hautes fréquences qui auraient été, dans d'autres conditions, noyés dans le bruit. Parmi les PSF utilisées lors de l'acquisition d'images, nous avons ensuite tenté d'utiliser des modes Hermite-Gauss, mais sans succès. Puis, nous avons réalisé que les faisceaux Bessel-Gauss d'ordres 0 et 1 seraient les modes laser optimaux. Cette méthode manque cependant d'un élément crucial : une sélection

automatique des paramètres de déconvolution. Cependant, le domaine de la déconvolution ne propose que rarement de tels moyens. Lorsqu'ils existent, ils sont proposés pour une utilisation bien spécifique. La méthode D-SLAM peut être vue comme une amélioration de la méthode SLAM où le traitement d'images est corrigé et amélioré. Cette méthode n'impose pas de compromis majeur sur le type d'échantillon observable, mais nécessite une étape de post-traitement plus complexe, permettant d'ajouter une méthode intermédiaire entre les méthodes de super-résolution les plus complexes et les plus simples.

Dans un troisième temps, une méthode de reconstruction tomographique en trois dimensions utilisant les faisceaux Bessel-Gauss comme projections en microscopie deux photons est proposée. Elle permet de reconstruire un volume à partir d'un nombre limité d'acquisitions en microscopie deux photons à profondeur de champ étendue. Avec un algorithme approprié pour l'étape de pré-traitement en déconvolution ainsi que pour la tomographie, cette méthode pourrait permettre de reconstruire un grand volume tout en gardant une bonne résolution latérale et axiale. Ce procédé permettrait de retrouver l'information volumétrique qui est perdue en microscopie deux photons à profondeur de champ augmentée avec moins d'acquisitions qu'une image d'un volume en microscopie deux photons classique. Pour compléter cette étude, qui reste théorique, il serait judicieux de caractériser expérimentalement le nombre d'acquisitions nécessaires pour obtenir une bonne reconstruction en trois dimensions, ainsi que de valider les résultats en utilisant des algorithmes de reconstruction plus avancés. La méthode décrite prend avantage des propriétés des faisceaux Bessel-Gauss pour proposer des acquisitions de grands champs de vue et de grande profondeur, et ce, avec un minimum de compromis sur la résolution et la vitesse d'acquisition.

# Annexe A

## Focalisation de faisceaux à proximité d'une interface plane

### A.1 Description du problème

Dans cette section est présentée une étude supplémentaire sur la focalisations des faisceaux, gaussien  $TEM_{00}$  et Bessel-Gauss d'ordre 0 de polarisation verticale, proches d'une ou deux interfaces entre deux ou trois milieux d'indices de réfraction différents. L'objectif est de vérifier et valider les approximations sur les conditions aux limites appliquées aux champs électriques calculées par la méthode Richard et Wolf utilisée en section 1.2.1. L'étude présentée ici est basée sur les calculs de champs introduits en [189] chap 3.9. Grâce à ces calculs nous obtiendrons des estimations plus précises des composantes de nos champs électriques lorsque le foyer est à une interface, ce qui est souvent le cas en microscopie puisqu'une lamelle est utilisée comme fenêtre pour observer l'échantillon.

La fig. A.1 présente un schéma simplifié de la focalisation d'un faisceau laser par un objectif (approximé par une lentille aplanétique) proche d'une interface entre deux milieux.

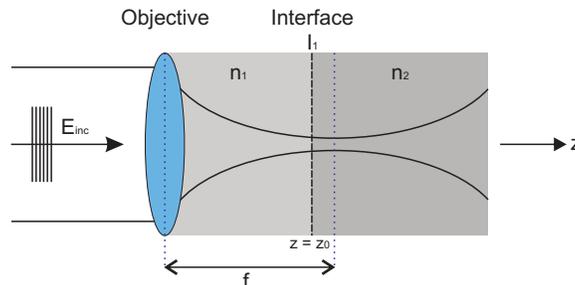


FIGURE A.1 – Schéma de la focalisation d'un faisceau laser proche d'une interface entre deux milieux.  $E_{inc}$  représente le champ électrique du faisceau incident,  $f$  est la distance focale de l'objectif.  $n_1$  et  $n_2$  sont les indices de réfraction des deux milieux. L'interface  $I_1$  est à une distance  $z = z_0$  du plan focal de l'objectif.

La prise en compte d'une interface entre deux milieux est une bonne chose. Cependant dans le cas de la microscopie, on est souvent confronté à deux interfaces, qui sont dues aux deux faces de la lamelle de verre utilisée. La fig. A.2 présente un schéma simplifié de la focalisation d'un faisceau laser par un objectif proche de deux interfaces, séparées par une distance  $d$ .

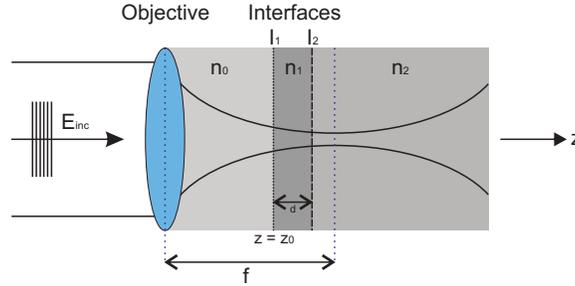


FIGURE A.2 – Schéma de la focalisation d'un faisceau laser proche de deux interfaces entre trois milieux.  $E_{inc}$  représente le champ électrique du faisceau incident,  $f$  est la distance focale de l'objectif.  $n_1$ ,  $n_2$  et  $n_3$  sont les indices de réfraction des trois milieux. l'interface  $I_1$  est à une distance  $z = z_0$  du plan focal de l'objectif et les deux interfaces sont séparées par une distance  $d$ .

Dans un premier temps le formalisme théorique ainsi que les calculs des équations des champs électriques seront présentés. Puis des résultats numériques des champs électriques des faisceaux gaussien  $TEM_{00}$  et Bessel-Gauss d'ordre 0 seront présentés dans le cas d'interfaces avec plusieurs milieux différents : air, eau, verre et milieux de montage DAKO.

## A.2 Formalisme théorique

### A.2.1 Champ électrique du faisceau transmis

Dans cette section nous présentons les calculs théoriques permettant d'obtenir les équations du champ électrique de faisceaux focalisés près d'une interface. Ces calculs sont basés sur la théorie vectorielle de diffraction de Richards et Wolf dans le cas de la focalisation de faisceaux proches d'interfaces entre plusieurs milieux [189]. La géométrie de focalisation est identique à celle présentée en 1.2.1.

L'expression du champ électrique réfracté par l'objectif, avant focalisation (champ lointain) est :

$$E_{inf}(\theta, \phi) = q_I(\theta) l_0(\theta, \phi) \hat{\mathbf{a}}(\theta, \phi) \quad (\text{A.1})$$

$q_I(\theta)$  est l'équivalent du facteur d'apodisation pour une lentille aplanétique (un objectif de microscope peut être approximé par une lentille aplanétique) dans le cas de la focalisation à une interface,  $\hat{\mathbf{a}}(\theta, \phi)$  le vecteur de polarisation et  $l_0(\theta, \phi)$  la distribution d'amplitude incidente réfractée par l'objectif.

Étant donné que nous ne souhaitons calculer que le champ électrique des faisceaux laser qui seront présents dans notre échantillon nous ne nous intéressons qu'au champ électrique transmis. En utilisant les conditions aux limites en  $z = z_0$  on peut exprimer le champ électrique transmis  $E_t$  en fonction de la partie transmise du champ réfracté par l'objectif  $E_t^{\text{inf}}$ .

$$\mathbf{E}_t(\rho, \varphi, z) = \frac{E_0}{2\pi} \int_0^{2\pi} \int_0^{\theta_{\text{max}}} E_t^{\text{inf}}(\theta, \phi) \frac{1}{k_{z2}} \exp(ik_1 z \cos\theta) \exp(ik\rho \sin\theta \cos(\phi - \varphi)) \cos\theta \sin\theta d\phi d\theta \quad (\text{A.2})$$

avec  $E_t^{\text{inf}} = q_I(\theta) l_0(\theta) \hat{\mathbf{a}}_t(\theta, \phi)$ .

Dans le cas d'un faisceau incident de polarisation linéaire (ici selon l'axe x) les coordonnées du vecteur de polarisation du champ transmis après réfraction, s'écrivent comme suit. Pour simplifier la notations les dépendances en  $(\theta, \varphi)$  des termes  $k_x(\theta, \varphi)$ ,  $k_y(\theta, \varphi)$  et  $k_{z1}(\theta, \varphi)$  ne seront plus précisées.

$$\begin{aligned} \hat{\mathbf{a}}_t(\theta, \varphi) = & t^s k_y^2 + t^p k_x^2 \frac{k_{z2}}{k_2} \hat{\mathbf{a}}_x \\ & -t^s k_x k_y + t^p k_x k_y \frac{k_{z2}}{k_2} \hat{\mathbf{a}}_y \\ & -t^p (k_x^2 + k_y^2) \frac{k_x}{k_2} \hat{\mathbf{a}}_z \end{aligned} \quad (\text{A.3})$$

Dans cette expression la différence entre les champs de polarisation s et p est prise en compte, la première partie de chaque terme représente la polarisation s et la seconde la polarisation p.

Il reste maintenant à exprimer les composantes du vecteur de polarisation en fonction de  $(\theta, \varphi)$ . On a  $k_x = k \sin\theta \cos\varphi$ ,  $k_y = k \sin\theta \sin\varphi$ ,  $k_{z1} = k_1 \cos\theta$  et  $k_{z2} = k_2 \sqrt{1 - \frac{k_1^2}{k_2^2} \sin^2\theta}$ . On obtient donc :

$$\begin{aligned} \hat{\mathbf{a}}_t(\theta, \varphi) = & t^s k^2 \sin^2\theta \frac{1 - \cos(2\varphi)}{2} + t^p k^2 \sin^2\theta \sqrt{1 - \frac{k_1^2}{k_2^2} \sin^2\theta} \frac{\cos(2\varphi) + 1}{2} \hat{\mathbf{a}}_x \\ & -t^s k^2 \sin^2\theta \frac{\sin(2\varphi)}{2} + t^p k^2 \sin^2\theta \sqrt{1 - \frac{k_1^2}{k_2^2} \sin^2\theta} \frac{\sin(2\varphi)}{2} \hat{\mathbf{a}}_y \\ & -t^p \frac{k^3 \sin^3\theta}{k_2} \cos\varphi \hat{\mathbf{a}}_z \end{aligned} \quad (\text{A.4})$$

En exprimant  $q_I(\theta) = \sqrt{\frac{k_{z1}}{k_x^2 + k_y^2}}$  on obtient l'expression suivante pour le champ électrique transmis d'un faisceau de polarisation linéaire focalisé près d'une interface :

$$E_t(\rho, \varphi, z) = \frac{E_0}{2\pi} \int_0^{2\pi} \int_0^{\theta_{\text{max}}} \exp(ik_{z2} z) \exp(i(k_{z1} - k_{z2}) z_0) \frac{1}{k_{z2}} \exp(ik\rho \sin\theta \cos(\phi - \varphi)) \hat{\mathbf{a}}_t q_I(\theta) l_0(\theta, \phi) \cos\theta \sin\theta d\phi d\theta \quad (\text{A.5})$$

On notera pour la suite  $e_z(\theta) = \exp(ik_{z_2}z) \exp(i(k_{z_1} - k_{z_2})z_0) \frac{1}{k_{z_2}}$  le terme regroupant les exponentielles dépendant de  $\theta$  uniquement.

En utilisant les tables d'intégrales présentées en [190] :

$$\int_0^{2\pi} \exp(i\gamma \cos(\phi - \varphi)) \begin{cases} \cos(m\phi) \\ \sin(m\phi) \end{cases} d\phi = 2\pi i^m J_m(\gamma) \begin{cases} \cos(m\varphi) \\ \sin(m\varphi) \end{cases} \quad (\text{A.6})$$

On obtient les expressions suivantes pour les trois composantes du champ électrique transmis :

$$E_{t_x}(\rho, \varphi, z) = \frac{E_0}{2\pi} \int_0^{\theta_{\max}} e_z(\theta) l_0(\theta) q_I(\theta) \cos\theta \sin\theta \begin{bmatrix} t^s \pi \sin^2\theta J_0(k\rho \sin\theta) \\ + t^s \pi \sin^2\theta J_2(k\rho \sin\theta) \cos(2\varphi) \\ - t^p \frac{\pi k_{z_2} \sin^2\theta}{k_2} J_2(k\rho \sin\theta) \cos(2\varphi) \\ + t^p \frac{\pi k_{z_2} \sin^2\theta}{k_2} J_0(k\rho \sin\theta) d\theta \end{bmatrix} \quad (\text{A.7})$$

$$E_{t_y}(\rho, \varphi, z) = \frac{E_0}{2\pi} \int_0^{\theta_{\max}} e_z(\theta) l_0(\theta) q_I(\theta) \cos\theta \sin\theta \begin{bmatrix} t^s \pi \sin^2\theta J_2(k\rho \sin\theta) \sin(2\varphi) \\ - t^p \frac{\pi k_{z_2} \sin^2\theta}{k_2} J_2(k\rho \sin\theta) \sin(2\varphi) d\theta \end{bmatrix} \quad (\text{A.8})$$

$$E_{t_z}(\rho, \varphi, z) = \frac{E_0}{2\pi} \int_0^{\theta_{\max}} e_z(\theta) l_0(\theta) q_I(\theta) \cos\theta \sin\theta \begin{bmatrix} -i t^p \frac{\pi k \sin^3\theta}{k_2} J_1(k\rho \sin\theta) \cos(\varphi) \end{bmatrix} d\theta \quad (\text{A.9})$$

Il reste maintenant à exprimer les coefficients de transmission  $t^s$  et  $t^p$  pour les polarisations s et p. Dans le cas de deux interfaces successives nous utiliserons les coefficients de transmission de Fresnel généralisés.

## A.2.2 Coefficients de transmission

Cette section a pour but de détailler les calculs permettant d'obtenir les coefficients de transmission pour les cas à une interface et deux interfaces. La fig. A.3 représente une vue schématique des interfaces qui seront prises en compte ainsi que les notations utilisées.

### Cas d'une interface unique

Dans le cas où une seule interface est considérée (fig. A.3-A) les coefficients de transmission

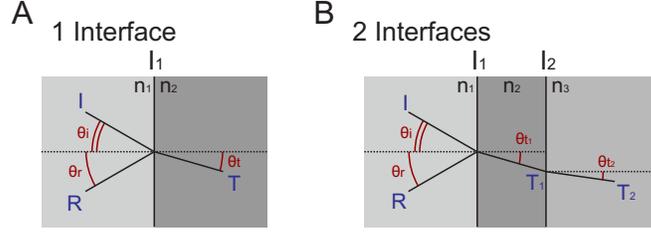


FIGURE A.3 – *A/* Schéma représentant le faisceau incident I, réfléchi R et transmis T à travers une interface  $I_1$  entre deux milieux  $n_1$  et  $n_2$ . *B/* Schéma représentant le faisceau incident I, réfléchi R et transmis  $T_1$  et  $T_2$  à travers deux interfaces successives  $I_1$  et  $I_2$  à travers trois milieux  $n_1$ ,  $n_2$  et  $n_3$ .

et de réflexion pour les polarisations s et p sont :

$$\begin{aligned} t^s &= \frac{2n_1 \cos \theta_i}{n_1 \cos \theta_i + n_2 \cos \theta_t} \\ t^p &= \frac{2n_1 \cos \theta_i}{n_1 \cos \theta_i + n_2 \cos \theta_t} \end{aligned} \quad (\text{A.10})$$

$$\begin{aligned} r^s &= \frac{n_1 \cos \theta_i - n_2 \cos \theta_t}{n_1 \cos \theta_i + n_2 \cos \theta_t} \\ r^p &= \frac{n_2 \cos \theta_i - n_1 \cos \theta_t}{n_1 \cos \theta_t + n_2 \cos \theta_i} \end{aligned} \quad (\text{A.11})$$

### Cas de deux interfaces successives

Dans le cas où deux interfaces successives sont considérées (fig. A.3-B) les coefficients de transmission pour les polarisations s et p sont :

$$\begin{aligned} t_g^s &= \frac{t_{1-2}^s t_{2-3}^s \exp(-2ik_{2z}d)}{1 + r_{1-2}^s r_{2-3}^s \exp(-2ik_{2z}d)} \\ t_g^p &= \frac{t_{1-2}^p t_{2-3}^p \exp(-2ik_{2z}d)}{1 + r_{1-2}^p r_{2-3}^p \exp(-2ik_{2z}d)} \end{aligned} \quad (\text{A.12})$$

Avec  $k_{2z} = k_2 \sqrt{1 - \frac{k_1^2}{k_2^2}}$ ,  $t_{1-2}$  et  $t_{2-3}$  les coefficients de transmission entre les milieux 1 et 2 puis 2 et 3 respectivement,  $r_{1-2}$  et  $r_{2-3}$  les coefficients de réflexion entre les milieux 1 et 2 puis 2 et 3 respectivement.

## A.3 Comparaison théorique entre faisceaux gaussiens et Bessel-Gauss

Dans cette section nous utiliseront les équations des champs électrique présentées à la section A.2.1 avec les coefficients de transmission calculés à la section A.2.2 pour obtenir les intensités des faisceaux gaussiens TEM<sub>00</sub> et Bessel-Gauss d'ordre 0 dans le cas où différentes interfaces

sont utilisées (avec leurs indices de réfraction) : air ( $n=1$ ), eau ( $n=1.33$ ), verre ( $n=1.5$ ) et milieu de montage DAKO ( $n=1.47$ ).

### A.3.1 Cas d'une interface unique

Cette section se focalise sur les différences lors de la focalisation les deux différents faisceaux considérés dans le cas où une interface unique est considérée. Les premières interfaces considérées sont les interfaces air/verre et eau/verre dont les intensités sont présentées à la fig. A.4.

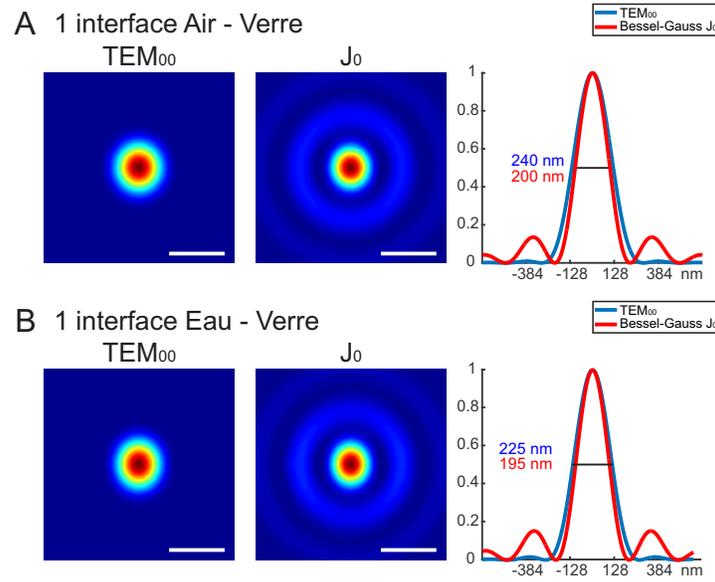


FIGURE A.4

Les prochaines interfaces considérées sont plus représentatives de la microscopie confocale puisqu'il s'agit des interfaces verre/eau et verre/DAKO. Ces interfaces représentent les interfaces entre la lamelle de verre et l'échantillon dans le cas de l'interface verre/eau, ainsi qu'entre la lamelle de verre et le milieu de montage dans le cas de l'interface verre/DAKO. Les figures d'intensité des deux faisceaux gaussien et Bessel-Gauss focalisés juste après ces interfaces ( $z = 0^+$ ) sont présentées à la fig. A.5.

Pour mieux considérer les interfaces en jeu, la prochaine section présentera les figures d'intensité des faisceaux gaussiens et Bessel-Gauss dans le cas où la focalisation se fait à travers deux interfaces.

### A.3.2 Cas à deux interfaces proches

Dans cette section la focalisation des faisceaux gaussiens et Bessel-Gauss de polarisation verticale est considérée comme traversant deux interfaces distinctes. Les interfaces ont été choisies

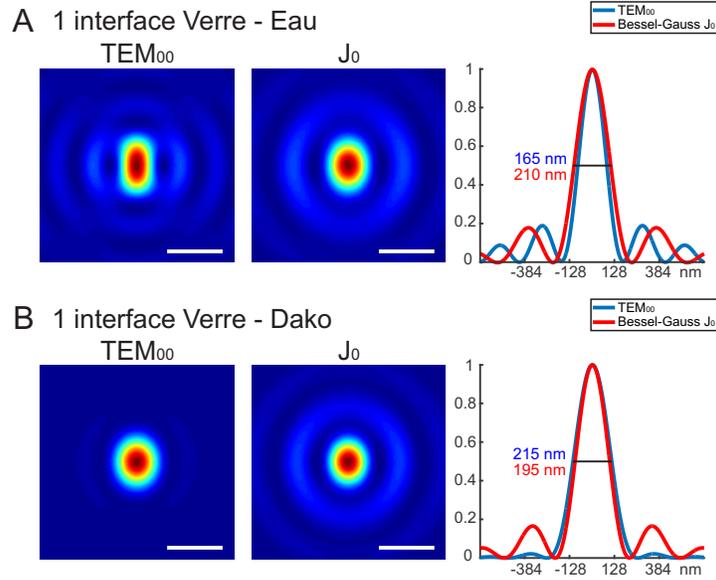


FIGURE A.5

pour mimer au mieux les conditions d'imagerie en microscopie dans le cas où une lamelle de verre est utilisée pour imager un échantillon fixé dans du milieu de montage DAKO ou non. De plus, différents milieux d'immersion sont considérés : l'air ( $n = 1$ ), l'eau ( $n = 1.33$ ) et les huiles d'immersion ( $n = 1.47$ ), que l'on considérera avoir un indice de réfraction proche du milieu de montage DAKO.

La fig. A.6 présente les figures d'intensité des faisceaux gaussiens et Bessel-Gauss dans le cas où aucun milieu d'immersion n'est utilisé (air) et dans les deux conditions, échantillon fixé dans du DAKO ou non (l'indice de l'eau sera considéré dans ce cas).

La fig. A.7 présente les figures d'intensité des faisceaux gaussiens et Bessel-Gauss dans le cas où de l'eau est utilisée comme milieu d'immersion et dans les deux conditions, échantillon fixé dans du DAKO ou non (l'indice de l'eau sera considéré dans ce cas).

La fig. A.8 présente les figures d'intensité des faisceaux gaussiens et Bessel-Gauss dans le cas où de l'huile est utilisée comme milieu d'immersion et dans les deux conditions, échantillon fixé dans du DAKO ou non (l'indice de l'eau sera considéré dans ce cas).

On remarquera que dans le cas où on considère la focalisation à travers les deux interfaces Eau/Verre et Verre/DAKO les figures d'intensité sont semblables aux distributions d'intensité présentées à la fig. 1.2 de la section 1.2.1. Cela nous permet donc de considérer que les approximations utilisées en section 1.2.1 sont suffisamment valides pour nous permettre une bonne estimation des distributions d'intensité des faisceaux considérés.

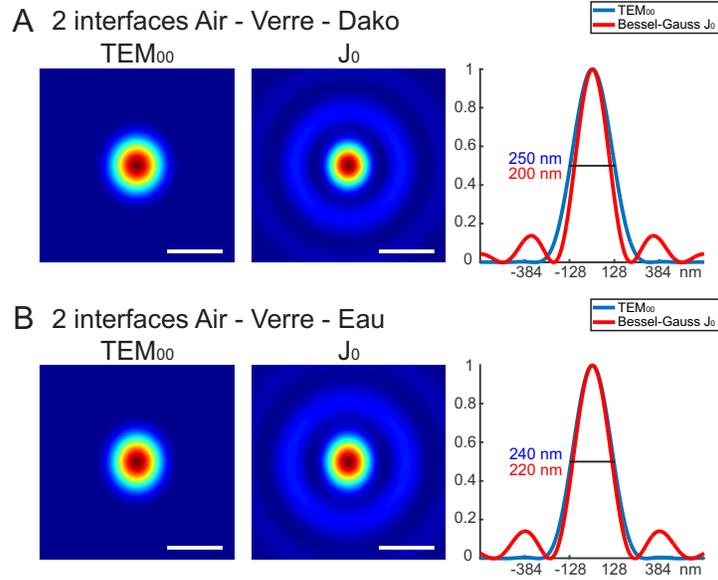


FIGURE A.6

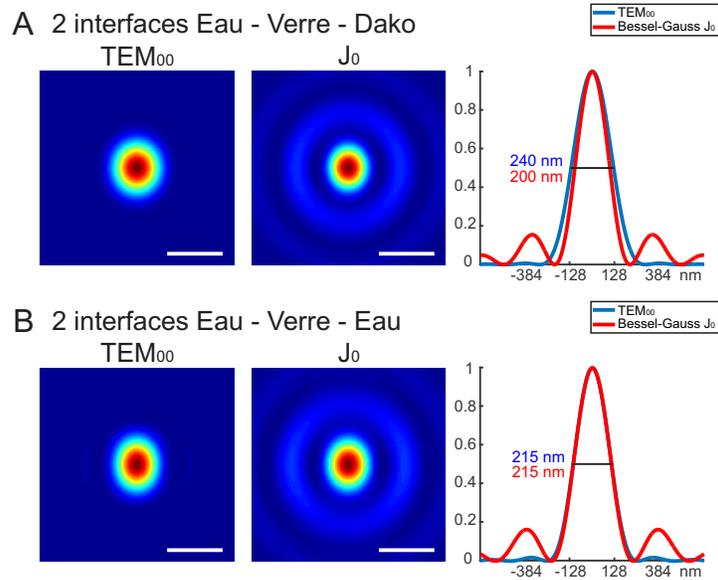


FIGURE A.7

### A.3.3 Discussion

Cette étude de la focalisation de faisceaux gaussiens et Bessel-Gauss près d'une ou deux interfaces a permis de valider l'approximation utilisée en section 1.2.1. De plus on remarque que, quelle que soit l'interface ou le couple d'interfaces considérés, le faisceau Bessel-Gauss est beaucoup moins affecté que le faisceau gaussien. En effet selon l'interface considérée le faisceau gaussien peut s'allonger fortement dans sa direction de polarisation et des lobes secondaires

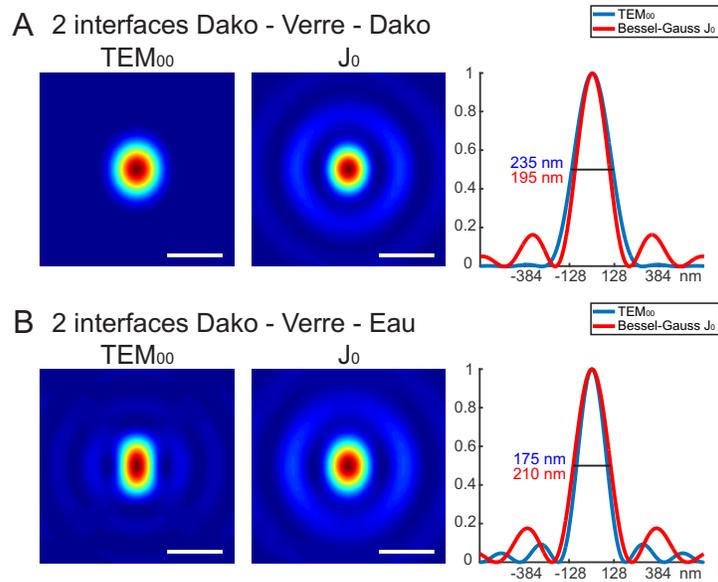


FIGURE A.8

apparaissent, alors que le faisceau Bessel-Gauss restera un faisceau Bessel-Gauss avec une largeur à mi-hauteur de son lobe central qui varie moins que celle du faisceau gaussien. Ce résultat appuie donc l'utilisation des faisceaux Bessel-Gauss en microscopie comme des faisceaux qui seront moins sensibles aux petits changements d'indice présents dans les échantillons biologiques : différences d'indices de réfraction entre les milieux intra et extra cellulaires et la membrane cellulaire.

## Annexe B

# Tests de qualité sur divers axicons

Cette section propose un protocole de test qualité pour évaluer l'efficacité des axicons à générer un faisceau Bessel-Gauss comme présenté en chapitre 1. Le but final est de réussir à déterminer si un axicon est de qualité suffisante pour être utilisé pour générer un faisceau Bessel-Gauss sans forcément à avoir à l'intégrer dans un microscope.

Nous avons dans un premier temps observé notre faisceau gaussien  $TEM_{00}$  de polarisation verticale utilisé pour ces tests qualité dont l'image est présentée à la fig. B.1.

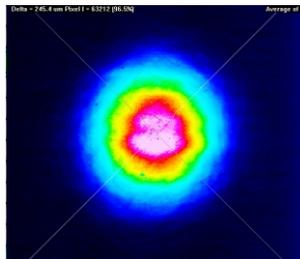


FIGURE B.1 – Image à la caméra du faisceau laser à l'entrée de l'axicon. Le faisceau est un faisceau  $TEM_{00}$  polarisé verticalement.

Pour cette étude nous avons utilisé six axicons ayant un angle à la base  $\beta$  de  $2.5^\circ$ . L'axicon utilisé en chapitre 1 (Axicon Louis) et un axicon de l'entreprise Bliq (Axicon Bliq 0) que nous considérons comme des axicons de qualité suffisante et qui nous serviront de points de repère, puis quatre axicons de chez Edmund Optics (Axicon IR 1,2,4,5).

### B.1 Test de qualité du faisceau Bessel-Gauss formé après l'axicon

Le premier test de qualité proposé est l'observation du faisceau Bessel généré par l'axicon seul, au niveau de la pointe de l'axicon puis après quelques centimètres de propagation. Après plusieurs centimètres de propagation il ne s'agit plus d'un faisceau Bessel-Gauss mais la forme

du faisceau observé pourrait nous aider à déterminer la qualité de l'axicon. Le faisceau a été observé à la caméra à plusieurs distances de l'axicon, à savoir 3 cm, 10 cm et 20 cm comme présenté à la fig. B.2.

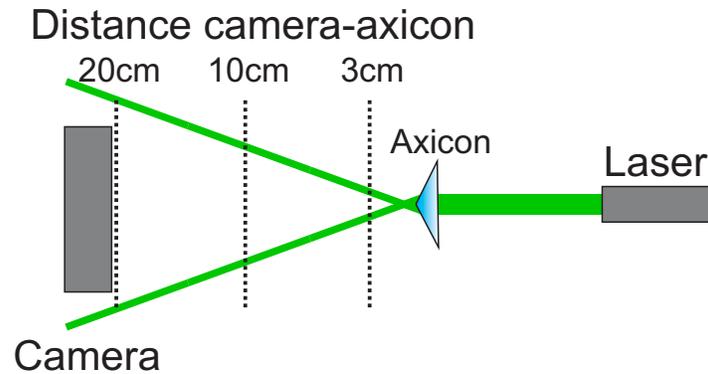


FIGURE B.2 – Schéma du montage utilisé pour le protocole de test de qualité du faisceau Bessel-Gauss à différentes distances après l'axicon. Les observations ont été répétées trois fois pour chaque axicon, avec la caméra placée à des distances de 3, 10 et 20 cm de l'axicon.

Les figures B.3, B.4 et B.5 montrent les images des faisceaux générés par les axicons aux distances de 3 cm, 10 cm et 20 cm respectivement.

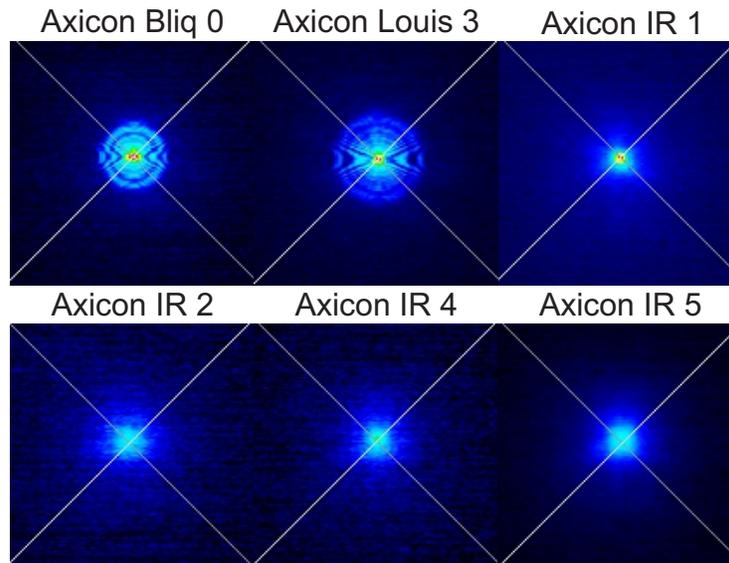


FIGURE B.3 – Images des faisceaux laser avec la caméra placée 3 cm après l'axicon.

Après avoir observé les faisceaux produits par les six axicons aux différentes distances, il apparaît clair que les axicons IR 1,2,4 et 5 sont bien différents des deux axicons de références. En regardant en détail, on remarque que l'axicon IR 1 est légèrement différent des axicons IR 2, 4 et 5. Les deux axicons de référence donnent également des résultats différents mais restent très proches l'un de l'autre.

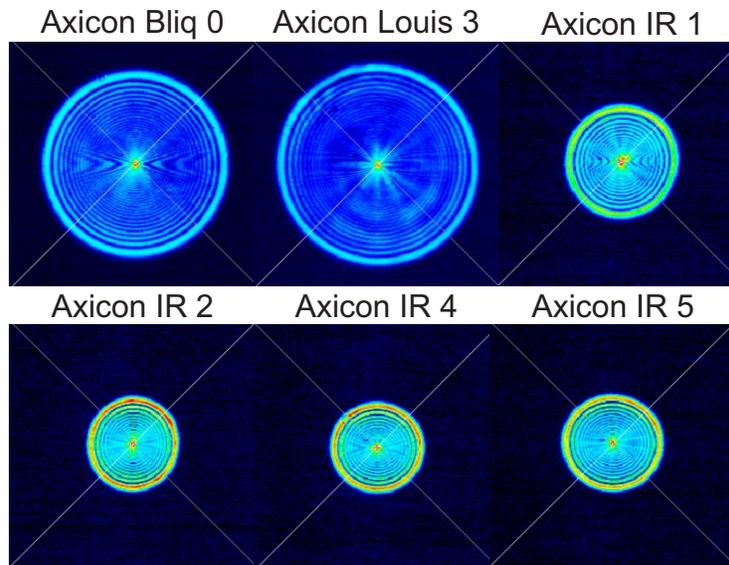


FIGURE B.4 – Images des faisceaux laser avec la caméra placée 10 cm après l’axicon.

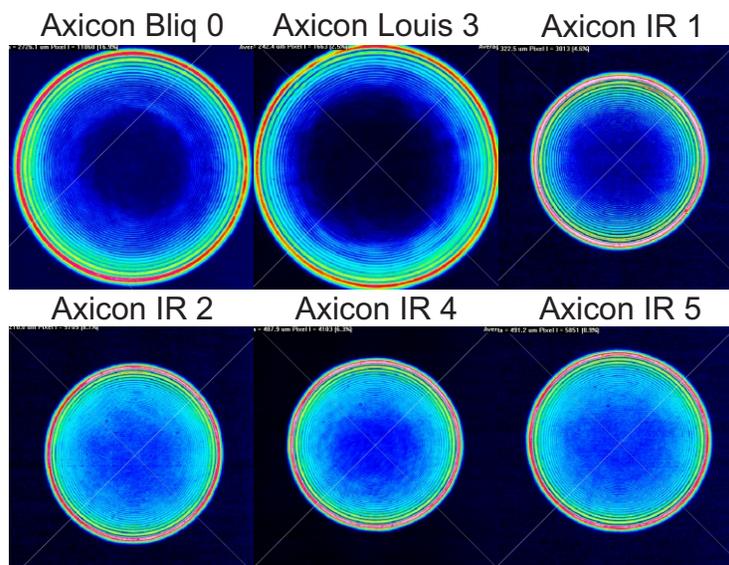


FIGURE B.5 – Images des faisceaux laser avec la caméra placée 20 cm après l’axicon.

## B.2 Test de qualité de l’anneau formé par une lentille placée à une distance focale de l’axicon

Le second test consiste à observer l’anneau formé à l’aide d’une lentille placée à une distance focale de l’axicon. Ces observations ont été effectuées à différentes distances après la lentille pour permettre une meilleure caractérisation des axicons. La figure B.6 montre un schéma du montage utilisé avec les trois distances d’observation : 5, 10 et 15 cm. La lentille utilisée possède une distance focale de 10 cm.

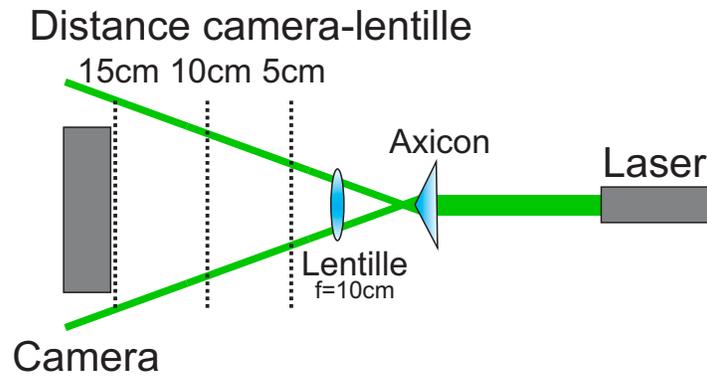


FIGURE B.6 – Schéma du montage utilisé pour le protocole de test de qualité de l’anneau formé à partir du faisceau Bessel-Gauss à différentes distances après la lentille. Les observations ont été répétées trois fois pour chaque axicon, avec la caméra placée à des distances de 5, 10 et 15 cm de la lentille.

Les figures B.7, B.8 et B.9 montrent les images des anneaux générées après les anneaux aux distances de 5 cm , 10 cm et 15 cm respectivement.

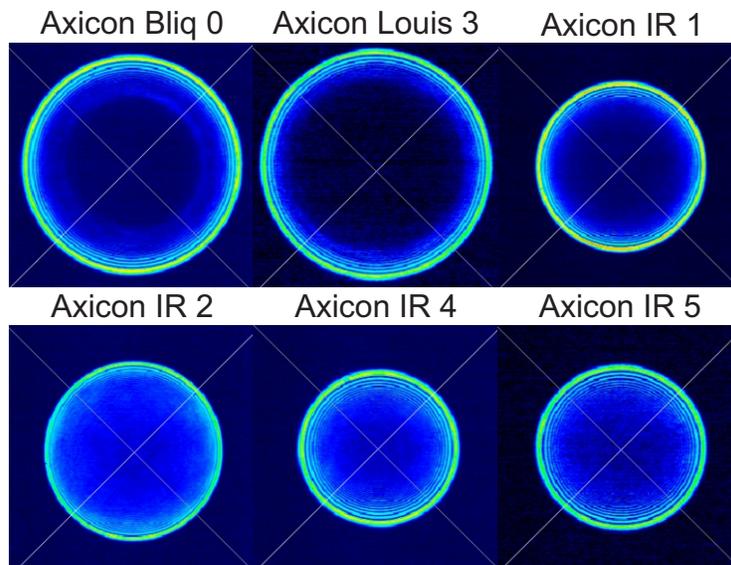


FIGURE B.7 – Images des faisceaux laser avec la caméra placée 5 cm après la lentille.

En observant les anneaux, on arrive aux mêmes conclusions que celles données en section B.1 à savoir que les quatre axicons IR 1, 2, 4 et 5 sont bien différents. De plus en observant la formation de l’anneau à la distance focale de la lentille (fig. B.8) les différences sont encore plus flagrantes. Les axicons IR 4 et 5 sont très similaires et forment un anneau avec un profil asymétrique. L’axicon IR 2 n’arrive pas à produire un anneau correct et l’axicon IR 1 réussit à générer un anneau, qui est cependant bien moins bon que ceux formés par les axicons Bliq 0 et axicon Louis. Pour que la méthode proposée au chapitre 1 soit efficace, il est nécessaire d’obtenir un anneau *mince*. Comme nous venons de le voir, seuls les deux premiers axicons

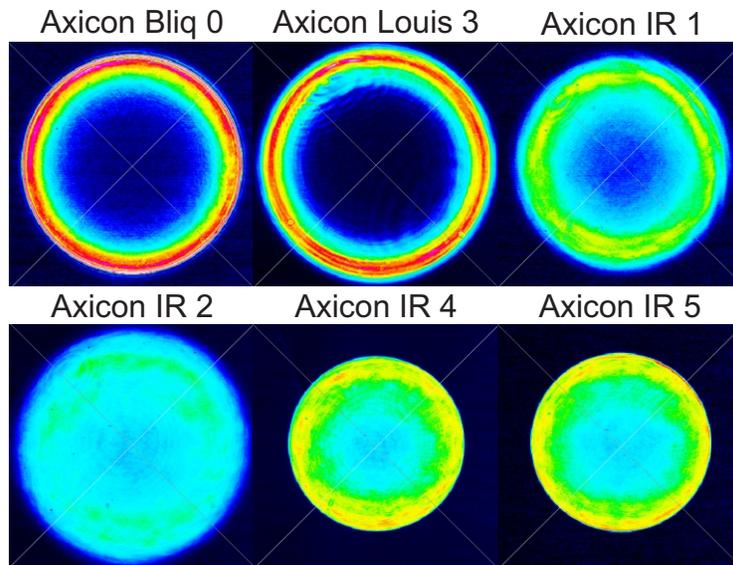


FIGURE B.8 – Images des faisceaux laser avec la caméra placée 10 cm après la lentille.

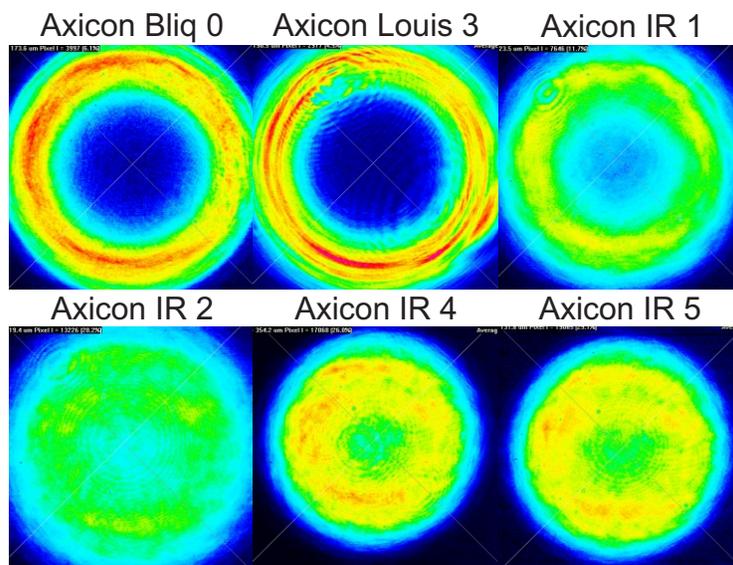


FIGURE B.9 – Images des faisceaux laser avec la caméra placée 15 cm après la lentille.

sont capables de produire un tel anneau.

### B.3 Mesure de faisceau Bessel-Gauss au point focal de l'objectif

Enfin, pour le test final, la qualité du faisceau Bessel-Gauss est mesurée en observant un échantillon de nano-sphères fluorescentes de 100 nm de diamètre. L'observation d'une nano-sphère si petite nous permet d'avoir un aperçu de la forme du faisceau Bessel-Gauss au point

focal. Pour chaque axicon la distance entre le sténopé et sa lentille associée à du être ajustée. Les différentes distances sont montrées à la fig. B.10. Ces observations ont été effectuées avec un sténopé d'une largeur de  $50 \mu\text{m} \approx 4 \text{ AU}$  pour nous permettre de voir les lobes secondaires du faisceau Bessel-Gauss, lobes qui jouent un rôle critique dans la construction d'un faisceau Bessel-Gauss.

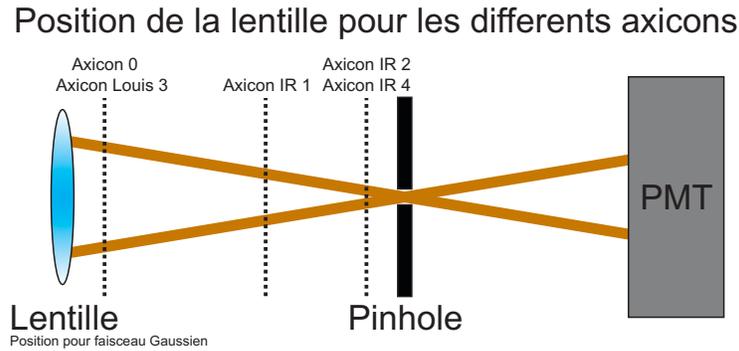


FIGURE B.10 – Schéma du positionnement de la lentille adjointe au sténopé montrant les ajustements nécessaires quant à la distance lentille-sténopé pour pouvoir observer un faisceau Bessel-Gauss au plan focal de l'objectif.

La figure B.11 montre une comparaison des différents faisceaux Bessel-Gauss au point focal. L'axicon IR 5 n'a pas été observé car les tests précédents ont montré qu'il était identique à l'axicon IR 4.

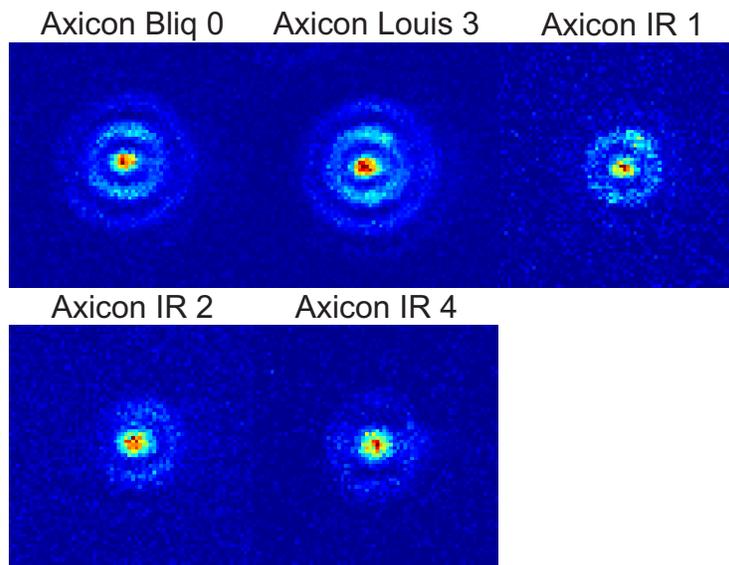


FIGURE B.11 – Images d'une nano-sphère fluorescente prises avec les différents faisceaux Bessel-Gauss générés par les différents axicons.

On remarque que les axicons Bliq 0 et axicon Louis 3 permettent la formation d'un faisceau Bessel-Gauss possédant plusieurs lobes secondaires, au moins deux (avec un troisième par-

tiellement visible), ce qui est signe d'un faisceau Bessel-Gauss de qualité. En revanche avec l'axicon IR 1, on obtient un faisceau Bessel-Gauss ne montrant qu'un seul lobe secondaire clairement visible (un second est partiellement visible), ce qui indique un faisceau Bessel-Gauss de moins bonne qualité. En ce qui concerne les axicons IR 2 et 4 le faisceau Bessel-Gauss observé ne possède qu'un anneau qui n'est même pas formé entièrement ; on peut dans ce cas à peine parler de faisceau Bessel-Gauss.

### **B.3.1 Discussion**

Nous avons donc réussi à définir une méthode de test qualité pour des axicons lorsqu'il s'agit de créer un faisceau Bessel-Gauss pour de l'imagerie en microscopie confocale. De toutes les observations présentées ci-dessus, la mesure de l'anneau mince à la distance focale de la lentille nous donne le plus de détail quant aux différences entre plusieurs axicons. Une autre mesure qui permet d'obtenir un aperçu rapide de la qualité de l'axicon est la mesure du faisceau Bessel juste après la pointe de l'axicon (3 cm dans notre cas). On remarque qu'avec cette mesure seuls les deux axicons qui donnent un bon faisceau Bessel-Gauss au plan focal produisent un faisceau avec des lobes secondaires (Axicon Bliq 0 et axicon Louis 3 fig. B.3).

Nous proposons donc d'utiliser les protocoles et mesures présentées dans ce chapitre comme point de comparaison lors de l'acquisition d'un nouvel axicon.

# Bibliographie

- [1] F.J. GALL et J.G. SPURZHEIM : *Anatomie et physiologie du système nerveux en général et du cerveau en particulier*. Paris : F. Schoell., 1810.
- [2] F.J. GALL : *Sur les fonctions du cerveau et sur celles de chacune de ses parties*. Chez J.-B. Baillière, 1825.
- [3] P.P. BROCA : Perte de la parole, ramollissement chronique et destruction partielle du lobe antérieur gauche du cerveau. *Bulletin de la Société Anthropologique*, 2:235–238, 1861.
- [4] C. GOLGI : Sulla struttura della sostanza grigia del cervello. *Gazz. Med. Ita. Lombarda*, 23:244–246, 1873.
- [5] S.R. CAJAL : Estructura del cerebelo. *Gac. Med. Catalana*, 11:449–457, 1888.
- [6] W. PENFIELD et T.B. RASMUSSEN : *The cerebral cortex of man : a clinical study of localization of function*. The Macmillan Company, New York, 1950.
- [7] G. EDELMAN et V.B. MOUNTCASTLE : *The Mindful Brain*. MIT Press, 1978.
- [8] The Human Connectome PROJECT : National Institute of Health. <http://www.humanconnectomeproject.org/>, 2009.
- [9] The Human Brain PROJECT : Commission européenne. <https://www.humanbrainproject.eu/>, 2013.
- [10] B. DUBUC, P. ROBERT et D. PAQUET : Le cerveau à tous les niveaux. <http://lecerveau.mcgill.ca/>.
- [11] D. PURVES, G.J. AUGUSTINE, D. FITZPATRICK, W.C. HALL, A-S. LAMANTIA, J.O. McNAMARA et S.M. WILLIAMS : *Neuroscience : third edition*. Sunderland (Massachusetts) : Sinauer Associates., 2004.
- [12] Wikipedia : LADYOFHATS : Complete neuron cell diagram. [https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Complete\\_neuron\\_cell\\_diagram\\_fr.svg?uselang=fr](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Complete_neuron_cell_diagram_fr.svg?uselang=fr), 2007.

- [13] Blausen.com STAFF : Medical gallery of Blausen Medical 2014, WikiJournal of Medicine 1 (2). [https://en.wikipedia.org/wiki/Neuroglia#/media/File:Blausen\\_0870\\_TypesofNeuroglia.png](https://en.wikipedia.org/wiki/Neuroglia#/media/File:Blausen_0870_TypesofNeuroglia.png), 2014.
- [14] A. DANI, B. HUANG, J. BERGAN, C. DULAC et X. ZHUANG : Super-resolution imaging of chemical synapses in the brain. *Neuron*, 68(5):843–856, 2010.
- [15] NATURE : Milestones in light microscopy. <http://www.nature.com/milestones/milelight/index.html>, 2009.
- [16] J. AL-KHALILI : In retrospect : Book of Optics. *Nature*, 518:164–165, 2015.
- [17] S. TOLANSKY : Frits Zernike 1888-1966. *Biographical Memoirs of Fellows of the Royal Society*, 13:392–402, 1967.
- [18] G. NOMARSKI : Microinterféromètre différentiel à ondes polarisées. *J. Phys. Radium*, 16:9S–11S, 1955.
- [19] G. STOKES : On the change of refrangibility of light. *Royal Society of London*, 142:463–562, 1852.
- [20] A. JABLONSKI : Efficiency of Anti-Stokes Fluorescence in Dyes. *Nature*, 131:839–840, 1933.
- [21] O. SHIMOMURA, F.H. JOHNSON et Y. SAIGA : Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusan, aequorea. *J. Cell. Comp. Physiol.*, 59(3):223–239, 1962.
- [22] L.D. HEBSHI, B.M. ANGRES, X.L. LI et S.R. KAIN : Green fluorescent protein. *eLS*, 2001.
- [23] B.R. MASTERS : The development of fluorescence microscopy. *eLS*, 2010.
- [24] B.R. MASTERS : History of the optical microscope in cell biology and medicine. *eLS*, 2008.
- [25] R. Y. TSIEN : Tsien laboratory. <http://www.tsienlab.ucsd.edu>.
- [26] J.R. SWEDLOW : Innovation in biological microscopy : Current status and future directions. *Bioessays*, 34(5):333–340, 2012.
- [27] Jeff HECHT : *Laser Pioneers*. Academic Press, 1992.
- [28] L. E. HARGROVE, R. L. FORK et M. A. POLLACK : Locking of He-Ne laser modes induced by synchronous intractivity modulation. *Appl. Phys. Lett.*, 5(4):4–5, 1964.
- [29] M. MINSKY : Microscopy apparatus. US Patent 3013467, 1961.
- [30] M. GÖPPERT-MAYER : Über elementarakte mit zwei quantensprüngen. *Ann. Phys*, 401(3):273–294, 1931.

- [31] W. KAISER et C.G.B. GARRETT : Two-Photon Excitation in CaF<sub>2</sub> - Eu<sup>2+</sup>. *Phys. Rev. Lett.*, 7(6):229–232, 1961.
- [32] W. DENK, J. STRICKLER et W. WEBB : Two-photon laser scanning fluorescence microscopy. *Science*, 248(4951):73–76, 1990.
- [33] S. RUZIN et H. AARON : 1p vs 2p fluorescence imaging. <http://microscopy.berkeley.edu/courses/tlm/2P/index.html>, 2017.
- [34] P. DAVIDOVITS et M.D. EGGER : Scanning laser microscope. *Nature*, 223(831), 1969.
- [35] R. HELLWARTH et P. CHRISTENSEN : Nonlinear optical microscopic examination of structure in polycrystalline ZnSe. *Opt. Commun.*, 12(3):318–322, 1974.
- [36] P.D. MAKER et R.W. TERHUNE : Study of Optical Effects Due to an Induced Polarization Third Order in the Electric Field Strength. *Phys. Rev.*, 137(3A):801–818, 1965.
- [37] W.M. TOLLES, J.W. NIBLER, J.R. McDONALD et A.B. HARVEY : A Review of the Theory and Application of Coherent Anti-Stokes Raman Spectroscopy (CARS). *Applied Spectroscopy*, 31(4):253–271, 1977.
- [38] S.W. HELL et J. WICHMANN : Breaking the diffraction resolution limit by stimulated emission : stimulated-emission-depletion fluorescence microscopy. *Opt. Lett.*, 19(11):780–782, 1994.
- [39] J.W. GOODMAN et R.W. LAWRENCE : Digital image formation from electronically detected holograms. *Appl. Phys. Lett.*, 11(3):77–79, 1967.
- [40] R.L. FORK : Laser Stimulation of Nerve Cells in Aplysia. *Science*, 171(3974):907–908, 1971.
- [41] H. DEHEZ : *Méthodes d'hyperrésolution optique et leurs applications pour l'imagerie biomédicale*. Thèse de doctorat, Université Laval, 2013.
- [42] M. BORN et E. WOLF : *Principles of Optics, Electromagnetic Theory of Propagation, Interference and Diffraction of Light*. Cambridge University Press, 1999.
- [43] B. BAILEY, D.L. FARKAS, D.L. TAYLOR et F. LANNI : Enhancement of axial resolution in fluorescence microscopy by standing-wave excitation. *Nature*, 366:44–48, 1993.
- [44] S.W. HELL et E.H.K. STELZER : Properties of a 4Pi confocal fluorescence microscope. *J. Opt. Soc. Am. A*, 9(12):2159–2166, 1992.
- [45] S.W. HELL, E.H.K. STELZER, S. LINDEK et C. CREMER : Confocal microscopy with an increased detection aperture : Type-B 4Pi confocal microscopy. *Opt. Lett.*, 19(3):222–224, 1994.
- [46] C. KISIELOWSKI, B. FREITAG, M. BISCHOFF, H. van LIN, S. LAZAR, G. KNIPPELS, P. TIEMEIJER, M. van der STAM, S. von HARRACH, M. STEKELENBURG, M. HAIDER,

- S. UHLEMANN, H. MÜLLER, P. HARTEL, B. KABUS, D. MILLER, I. PETROV, E.A. OLSON, T. DONCHEV, E.A. KENIK, A.R. LUPINI, J. BENTLEY, S.J. PENNYCOOK, I.M. ANDERSON, A.M. MINOR, A.K. SCHMID, T. DUDEN, V. RADMILOVIC, Q.M. RAMASSE, M. WATANABE, R. ERNI, E.A. STACH, P. DENES, et U. DAHMEN : Detection of single atoms and buried defects in three dimensions by aberration-corrected electron microscope with 0.5-Å information limit. *Microscopy and Microanalysis*, 14(5):469–477, 2008.
- [47] R.P. ERNI : Atomic resolution imaging with a sub-50 pm electron probe. *Phys. Rev. Lett.*, 102(9):096101, 2009.
- [48] M. SCOTUZZI, J. KUIPERS, D.I. WENSVEEN, P. de BOER, K.C.W. HAGEN, J.P. HOOGENBOOM et B.N.G. GIEPMANS : Multi-color electron microscopy by element-guided identification of cells, organelles and molecules. *Sci. Rep.*, 7(45970), 2017.
- [49] N. de JONGE et F.M. ROSS : Electron microscopy of specimens in liquid. *Nature Nanotechnology*, 6:695–704, 2011.
- [50] E. WEGEL, A. GÖHLER, B.C. LAGERHOLM, A. WAINMAN, S. UPHOFF, R. KAUFMANN et I.M. DOBBIE : Imaging cellular structures in superresolution with SIM, STED and Localisation Microscopy : A practical comparison. *Sci. Rep.*, 6(27290), 2016.
- [51] Y. OKADA : Current limitations in super-resolution fluorescence microscopy for biological specimens : how deep can we go from the cover glass ? *In SPIE Technologies and Applications of Structured Light*, volume 10251, pages 102510I–102510I–4, 2017.
- [52] V. SCHUBERT : Super-resolution microscopy – applications in plant cell research. *Front. Plant Sci.*, 8:531, 2017.
- [53] C. CREMERA, A. SZCZUREK, F. SCHOCK, A. GOURRAM et U. BIRK : Super-resolution microscopy approaches to nuclear nanostructure imaging. *Methods*, 2017.
- [54] R. HEINTZMANN et G. FICZ : *Methods in Cell Biology, Volume 114, Chapitre 22*. Oxford University Press, 2006.
- [55] R. HAN, Z. LI, Y. FAN et Y. JIANG : Recent advances in super-resolution fluorescence imaging and its applications in biology. *J. Genetics and Genomics*, 40:583–595, 2013.
- [56] S. COX : Super-resolution imaging in live cells. *Developmental Biology*, 401(1):175–181, 2014.
- [57] J.C. VAUGHAN : Super-resolution microscopy made simple. *In Optics in the Life Sciences Congress*, page NM3C.1, 2017.
- [58] J. REQUEJO-ISIDRO : Fluorescence nanoscopy. methods and applications. *J. Chem. Biol.*, 6:97–120, 2013.
- [59] S.W. HELL : Far-field optical nanoscopy. *Science*, 316:1153–1158, 2007.

- [60] M. YAMANAKA, N.I. SMITH et K. FUJITA : Introduction to super-resolution microscopy. *Microscopy*, 63(3):177–192, 2014.
- [61] B. HUANG, H. BABCOCK et X. ZHUANG : Breaking the diffraction barrier : Super-resolution imaging of cells. *Cell*, 143(7):1047–1058, 2010.
- [62] C.G. GALBRAITH et J.A. GALBRAITH : Super-resolution microscopy at a glance. *J. Cell Science*, 124:1607–1611, 2011.
- [63] D. TOOMRE et J. BEWERSDORF : A new wave of cellular imaging. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, 26:285–314, 2010.
- [64] A.M. SYDOR, K.J. CZYMEK, E.M. PUCHNER et V. MENNELLA : Super-resolution microscopy : From single molecules to supramolecular assemblies. *Trends in Cell Biology*, 25(12):730–748, 2015.
- [65] S. van de LINDE, M. HEILEMANN et M. SAUER : Live-cell super-resolution imaging with synthetic fluorophores. *Annu. Rev. Phys. Chem.*, 63:519–540, 2013.
- [66] L. SCHERMELLEH, R. HEINTZMANN et H. LEONHARDT : A guide to super-resolution fluorescence microscopy. *J. Cell Biol.*, 190(1):165–175, 2010.
- [67] M. HEILEMANN : Fluorescence microscopy beyond the diffraction limit. *J. Biotechnology*, 149:243–251, 2010.
- [68] B. HUANG, M. BATES et X. ZHUANG : Super resolution fluorescence microscopy. *Annu. Rev. Biochem.*, 78:993–1016, 2009.
- [69] C. COLTHARP et J. XIAO : Superresolution microscopy for microbiology. *Cell. Microbiol.*, 14(12):1808–1818, 2012.
- [70] A.G. GODIN, B. LOUNIS et L. COGNET : Super-resolution microscopy approaches for live cell imaging. *Biophys. J.*, 107:1777–1784, 2014.
- [71] U. AGRAWAL, D.T. REILLY et C.M. SCHROEDER : Zooming in on biological processes with fluorescence nanoscopy. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 24(4):646–653, 2013.
- [72] K. NIENHAUS et G.U. NIENHAUS : Where do we stand with super-resolution optical microscopy ? *J. Mol. Biol.*, 428(2):308–322, 2016.
- [73] E.F. FORNASIERO et F. OPAZO : Super-resolution imaging for cell biologists : concepts, applications, current challenges and developments. *Bioessays*, 37(15):436–451, 2015.
- [74] Z. YANG, A. SHARMA, J. QI, X. PENG, D.Y. LEE, R. HU, D. LIN, J. QU et J.S. KIM : Super-resolution fluorescent materials : an insight into design and bioimaging applications. *Chem. Soc. Rev.*, 45(17):4651–4667, 2016.
- [75] M. MAGLIONE et S.J. SIGRIST : Seeing the forest tree by tree : super-resolution light microscopy meets the neurosciences. *Nature Neuroscience*, 16:790–797, 2013.

- [76] J. TØNNESEN et U.V. NÄGERL : Superresolution imaging for neuroscience. *Experimental Neurology*, 242:33–40, 2013.
- [77] N. EHMANN, M. SAUER et R.J. KITTEL : Super-resolution microscopy of the synaptic active zone. *Front. Cell. Neurosci.*, 9(7):1–8, 2015.
- [78] X. WANG, J. WANG, X. ZHU, Y. ZHENG, K. SI et W. GONG : Super-resolution microscopy and its applications in neuroscience. *J. Innovative Optical Health Sciences*, 10(5):1730001, 2017.
- [79] S. HELL et E.H.K. STELZER : Properties of a 4Pi confocal fluorescence microscope. *J. Opt. Soc. Am. A*, 9(12):2159–2166, 1992.
- [80] H. GUGEL, J. BEWERSDORF, S. JAKOBS, J. ENGELHARDT, R. STORZ et S.W. HELL : Cooperative 4Pi Excitation and Detection Yields Sevenfold Sharper Optical Sections in Live-Cell Microscopy. *Biophysical J.*, 87(6):4146–4152, 2004.
- [81] Zeiss Microscopy Online CAMPUS : Introduction so superresolution microscopy. <http://zeiss-campus.magnet.fsu.edu/articles/superresolution/introduction.html>, 2014.
- [82] M.G.L. GUSTAFSSON, D.A. AGARD et J.W. SEDAT : Sevenfold improvement of axial resolution in 3d wide-field microscopy using two objective lenses. *In Three-Dimensional Microscopy : Image Acquisition and Processing II*. SPIE, 1995.
- [83] M.G.L. GUSTAFSSON, D.A. AGARD et J.W. SEDAT : I5M : 3D widefield light microscopy with better than 100 nm axial resolution. *J. Microscopy*, 195(1):10–16, 1999.
- [84] J. BEWERSDORF, R. SCHMIDT et Hell SW. : Comparison of I5M and 4Pi-microscopy. *J. Microsc.*, 222(2):105–15, 2006.
- [85] E.J. AMBROSE : A surface contact microscope for the study of cell movements. *Nature*, 178(4543):1194, 1956.
- [86] L. SAVAGE : Improving Plant Cell Analysis Requires Good TIRF. *BioPhotonics*, 2011.
- [87] E.H. SYNGE : A suggested method for extending the microscopic resolution into the ultramicroscopic region. *Phil. Mag.*, 6(356), 1928.
- [88] E.A. ASH et G. NICHOLLS : Super-resolution aperture scanning microscope. *Nature*, 237(5357):510–512, 1972.
- [89] H.A. HUCKABAY, K.P. ARMENDARIZ, W.H. NEWHART, S.M. WILDGEN et R.C. DUNN : Near-field scanning optical microscopy for high-resolution membrane studies. *Methods Mol. Biol.*, 950:373–394, 2013.
- [90] L. NOVOTNY et S.J. STRANICK : Near-field optical microscopy and spectroscopy with pointed probes. *Annu. Rev. Phys. Chem.*, 57:303–331, 2006.

- [91] T. SAIKI : Recent advances in near-field optical microscopy. *In 2002 International Microprocesses and Nanotechnology Conference, 2002. Digest of Papers.*, pages 6–7, 2002.
- [92] Y. OSHIKANE, T. KATAOKA, M. OKUDA, S. HARA, H. INOUE et M. NAKANO : Observation of nanostructure by scanning near-field optical microscope with small sphere probe. *Science and Technology of Advanced Materials*, 8(3):181, 2007.
- [93] S. W. HELL : Far-field optical nanoscopy. *Science*, 316(5828):1153–1158, 2007.
- [94] K. OTOMO, T. HIBI, Y. KOZAWA et T. NEMOTO : STED microscopy—super-resolution bio-imaging utilizing a stimulated emission depletion. *Microscopy*, 64(4):227–236, 2015.
- [95] G. DONNERT, J. Keller et R. MEDDA, M.A. ANDREI, S.O. RIZZOLI, R. LUHRMANN, R. JAHN, C. EGGELING et S.W. HELL : Macromolecular-scale resolution in biological fluorescence microscopy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 103(31):11440–11445, 2006.
- [96] E. BETZIG, G.H. PATTERSON, R. SOUGRAT, O.W. LINDWASSER, S. OLENYCH, J.S. BONIFACINO, M.W. DAVIDSON, J. LIPPINCOTT-SCHWARTZ et H.F. HES : Imaging intracellular fluorescent proteins at nano-meter resolution. *Science*, 313(5793):1642–1645, 2006.
- [97] M.J. RUST, M. BATES et X. ZHUANG : Sub-diffraction-limit imaging by stochastic optical reconstruction microscopy (STORM). *Nat. Methods*, 3(10):793–795, 2006.
- [98] NIKON : Microscopyu. <https://www.microscopyu.com/tutorials/stochastic-optical-reconstruction-microscopy-storm-imaging>.
- [99] D. GABOR : A new microscopic principle. *Nature*, 161(4098):777, 1948.
- [100] P. MARQUET, C. DEPEURSINGE et P.J. MAGISTRETTI : Review of quantitative phase-digital holographic microscopy : promising novel imaging technique to resolve neuronal network activity and identify cellular biomarkers of psychiatric disorders. *Neurophotonics*, 1(2):020901, 2014.
- [101] J. KÜHN, F. CHARRIÈRE, T. COLOMB, E. CUCHE, F. MONTFORT, Y. EMERY, P. MARQUET et C. DEPEURSINGE : Axial sub-nanometer accuracy in digital holographic microscopy. *Meas. Sci. Technol.*, 19(7):074007, 2008.
- [102] Wikipedia : EGELBERG : Optical setup of digital holographic microscopy (DHM). <https://en.wikipedia.org/wiki/File:OpticalSetupDHM.jpg>, 2010.
- [103] M.K. KIM : Principles and techniques of digital holographic microscopy. *J. Photon. Energy.*, page 018005, 2010.
- [104] M.G. GUSTAFSSON : Surpassing the lateral resolution limit by a factor of two using structured illumination microscopy. *J. Microscopy*, 198(2):82–87, 2000.
- [105] M. SAXENA, G. ELURU et S.S. GORTHI : Structured illumination microscopy. *Advances in Optics and Photonics*, 7(2):241–275, 2015.

- [106] hhmi : JANELIA : Live cell multicolor structured illumination microscope. <https://www.janelia.org/open-science/advanced-imaging-center/instruments/live-cell-multicolor-structured-illumination>.
- [107] H. DEHEZ, M. PICHÉ et Y. De KONINCK : Resolution and contrast enhancement in laser scanning microscopy using dark beam imaging. *Opt. Express*, 21(13):7128–7141, Juillet 2013.
- [108] C. KUANG, S. LI, W. LIU, X. HAO, Z. GU, Y. WANG, J. GE, H. LI et X. LIU : Breaking the diffraction barrier using fluorescence emission difference microscopy. *Sci. Rep.*, 3(1441), Mars 2013.
- [109] A. GASECKA, A. DARADICH, H. DEHEZ, M. PICHÉ et D CÔTÉ : Resolution and contrast enhancement in coherent anti-Stokes Raman-scattering microscopy. *Opt. Lett.*, (38): 4510–4513, 21 2013.
- [110] C.B. MÜLLER et J. ENDERLEIN : Image scanning microscopy. *Phys. Rev. Lett.*, 104(19): 198101, 2010.
- [111] C.ROIDER, R. PIESTUN et A. JESACHER : 3D image scanning microscopy with engineered excitation and detection. *Optica*, 4(11):1373–138, 2017.
- [112] T. DERTINGER, R. COLYER, R. VOGEL, M. HEILEMANN, M. SAUER, J. ENDERLEIN et S. WEISS : Superresolution optical fluctuation imaging (SOFI). *Adv. Exp. Med. Biol.*, 733:17–21, 2012.
- [113] D.T. BURNETTEA, P. SENGUPTAA, Y. DAIB, J. LIPPINCOTT-SCHWARTZA et B. KACHARB : Bleaching/blinking assisted localization microscopy for superresolution imaging using standard fluorescent molecules. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 108(52):21081–21086, 2011.
- [114] S. MUNCK, K. MISKIEWICZ, R. SANNERUD, S.A. MENCHON, L. JOSE, R. HEINTZMANN, P. VERSTREKEN et W. ANNAERT : Sub-diffraction imaging on standard microscopes through photobleaching microscopy with non-linear processing. *J. Cell. Sci.*, 125:2257–2266, 2012.
- [115] F. BALZAROTTI, Y. EILERS, K.C. GWOSCH, A.H. GYNNA, V. WESTPHAL, F.D. STEFANI, J. ELF et S.W. HELL : Nanometer resolution imaging and tracking of fluorescent molecules with minimal photon fluxes. *Science*, 355(6325):606–612, 2017.
- [116] Tj.R. BONTEKOE, E. KOPER et D.J.M. KESTER : Pyramid maximum entropy images of IRAS survey data. *Astronomy and Astrophysics*, 283(3):1037–1053, 1994.
- [117] F. MARCHIS, R. PRANGÉ et J. CHRISTOU : Adaptive Optics Mapping of Io’s Volcanism in the Thermal IR (3.8  $\mu$ m). *Icarus*, 148(2):384–396, 2000.
- [118] L.M. MUGNIER, C. ROBERT, J. CONAN, V. MICHAU et S. SALEM : Myopic deconvolution from wave-front sensing. *J. Opt. Soc. Am. A*, 18(4):862–872, 2001.

- [119] L.M. MUGNIER, T. FUSCO et J. CONAN : Mistral : a myopic edge-preserving image restoration method, with application to astronomical adaptive-optics-corrected long-exposure images. *J. Opt. Soc. Am. A*, 21(10):1841–1854, 2004.
- [120] F. SOULEZ : *Une approche problèmes inverses pour la reconstruction de données multidimensionnelles par méthodes d'optimisation*. Thèse de doctorat, Université Jean Monnet, 2008.
- [121] W. WALLACE, L.H. SCHAEFER et J.R. SWEDLOW : A workingperson's guide to deconvolution in light microscopy. *BioTechniques*, 31(5):1076–1097, 2001.
- [122] E.F.Y. HOM, F. MARCHIS, T.K. LEE, S. HAASE, D.A. AGARD et J.W. SEDAT : Aida : An adaptive image deconvolution algorithm with application to multi-frame and three-dimensional data. *J. Opt. Soc. Am. A*, 24(6):1580–1600, 2007.
- [123] F. SOULEZ, L. DENIS, Y. TOURNEUR et É. THIÉBAUT : Blind deconvolution of 3d data in wide field fluorescence microscopy. In *2012 9th IEEE International Symposium on Biomedical Imaging (ISBI)*, pages 1735–1738, May 2012.
- [124] A. TARANTOLA : *Inverse Problem Theory and Methods for Model Parameter Estimation*. Society for Industrial Mathematics, 2005.
- [125] D.A. AGARD : Optical sectioning microscopy : cellular architecture in three dimensions. *Annu. Rev. Biophys. Bioeng*, 13:191–219, 1984.
- [126] P.J. SHAW et D.J. RAWLINS : The point-spread function of a confocal microscope : its measurement and use in deconvolution of 3-d data. *J. Microscopy*, 163(2):151–165, 1991.
- [127] G.J. BRAKENHOFF, H.T. van der VOORT, E.A. van SPRONSEN et N. NANNINGA : 3-dimensional imaging of biological structures by high resolution confocal scanning laser microscopy. *Scanning Microsc.*, 2(1):33–40, 1988.
- [128] R. ZANELLA, G. ZANGHIRATI, R. CAVICCHIOLI, L. ZANNI, P. BOCCACCI, M. BERTERO et G. VICIDOMINI : Towards real-time image deconvolution : application to confocal and STED microscopy. *Scientific Reports*, 3(2523), 2013.
- [129] Scientific Volume Imaging. Deconvolution Visualization ANALYSIS : Huygens deconvolution. <https://svi.nl/HuygensDeconvolution>.
- [130] D. SAGE, L. DONATI, F. SOULEZ, D. FORTUN, G. SCHMIT, A. SEITZ, R. GUIET, C. VONNESH et M. UNSER : Deconvolutionlab2 : An open-source software for deconvolution microscopy. *Methods - Image Processing for Biologists*, 115:28–41, 2017.
- [131] G. Toraldo di FRANCIA : Resolving power and information. *J. Opt. Soc. Am.*, 45(7):497–501, 1955.
- [132] C.W. MCCUTCHEN : Superresolution in Microscopy and the Abbe Resolution Limit. *J. Opt. Soc. Am.*, 57(10):1190–1192, 1967.

- [133] I. J. COX et C. J. R. SHEPPARD : Information capacity and resolution in an optical system. *J. Opt. Soc. Am. A*, 3(8):1152–1158, 1986.
- [134] F. HELMCHEN et W. DENK : Deep tissue two-photon microscopy. *Nature Methods*, 2:932–940, 2005.
- [135] W.A. van CAPPELLEN, A. NIGG et A.B. HOUTSMULLER : *Cellular Imaging Techniques for Neuroscience and Beyond, Chap 3*. Academic Press is an imprint of Elsevier, 22001122.
- [136] K.N. FISH : Total Internal Reflection Fluorescence (TIRF) Microscopy. *Curr. Protoc. Cytom.*, 50(12):1–12, 2009.
- [137] T. YUAN, L. LIU, Y. ZHANG, L. WEI, S. ZHAO, X. ZHENG, X. HUANG, J. BOULANGER, C. GUEUDRY, J. LU, L. XIE, W. DU, W. ZONG, L. YANG, J. SALAMERO, Y. LIU et L. CHEN : Diacylglycerol guides the hopping of clathrin-coated pits along microtubules for exo-endocytosis coupling. *Dev. Cell.*, 35(1):120–130, 2015.
- [138] S. YONGHO et J. WONHO : High-speed near-field scanning optical microscopy with a quartz crystal resonator. *Rev. Sci. Instr.*, 73:2057, 2002.
- [139] E. SEZGIN : Super-resolution optical microscopy for studying membrane structure and dynamics. *J. Physics : Condensed Matter*, 29(27):273001, 2017.
- [140] R. SCHMIDT, C.A. WURM, S. JAKOBS, J. ENGELHARDT, A. EGNER et S.W. HELL : Spherical nanosized focal spot unravels the interior of cells. *Nature Methods*, 5:539–544, 2008.
- [141] R. SCHMIDT, C.A. WURM, A. PUNGE, A. EGNER, S. JAKOBS et S.W. HELL : Mitochondrial cristae revealed with focused light. *Nano Lett*, 9(6):2508–2510, 2009.
- [142] Y. WU, X. WU, R. LU, J. ZHANG, L. TORO et E. STEFANI : Resonant Scanning with Large Field of View Reduces Photobleaching and Enhances Fluorescence Yield in STED Microscopy. *Sci. Rep.*, 5(14766):1–12, 2015.
- [143] J. KWON, J. HWANG, J. PARK, G.R. HAN, K.Y. HAN et S.K. KIM : Resolft nanoscopy with photoswitchable organic fluorophores. *Sci. Rep.*, 5(17804), 2015.
- [144] I. TESTA, E. D’ESTE, N.T. URBAN, F. BALZAROTTI et S.W. HELL : Dual Channel RESOLFT Nanoscopy by Using Fluorescent State Kinetics. *Nano Lett.*, 15(1):103–106, 2015.
- [145] M. MEHEDI, M. SMELKINSON, J. KABAT, S. GANESAN, P.L. COLLINS et U.J. BUCHHOLZ : Multicolor Stimulated Emission Depletion (STED) Microscopy to Generate High-resolution Images of Respiratory Syncytial Virus Particles and Infected Cells. *Bio Protoc.*, 7(17):e2543, 2017.

- [146] J.J. SIEBER, K.L. WILLIG, C. KUTZNER, C. GERDING-REIMERS, B. HARKE, G. DONNERT, B. RAMMNER, C. EGGELING, S.W. HELL, H. GRUBMÜLLER et T. LANG : Anatomy and dynamics of a supramolecular membrane protein cluster. *Science*, 317(5841):1072–1076, 2007.
- [147] G. van den BOGAART, K. MEYENBERG, H.J. RISSELADA, H. AMIN, K.I. WILLIG, B.E. HUBRICH, M. DIER, S.W. HELL, H. GRUBMÜLLER, U. DIEDERICHSEN et R. JAHN : Membrane protein sequestering by ionic protein–lipid interactions. *Nature*, 479:552–555, 2011.
- [148] V. WESTPHAL, S.O. RIZZOLI, M.A. LAUTERBACH, D. KAMIN, R. JAHN et S.W. HELL : Video-rate far-field optical nanoscopy dissects synaptic vesicle movement. *Science*, 320(5873):246–249, 2008.
- [149] L. LAU, Y.L. LEE, S.J. SAHL, T. STEARNS et W.E. MOERNER : STED microscopy with optimized labeling density reveals 9-fold arrangement of a centriole protein. *Biophys. J.*, 102(12):2926–2935, 2012.
- [150] G. MONERON et S.W. HELL : Two-photon excitation STED microscopy. *Opt. Express*, 17(17):14567–14573, 2009.
- [151] T.J. GOULD, D. BURKE, J. BEWERSDORF et M.J. BOOTH : Adaptive optics enables 3D STED microscopy in aberrating specimens. *Opt. Express*, 20(19):20998–21009, 2012.
- [152] D. GREENFIELD, A.L. MCEVOY, H. SHROFF, G.E. CROOKS, N.S. WINGREEN, E. BETZIG et J. LIPHARDT : Self-organization of the escherichia coli chemotaxis network imaged with super-resolution light microscopy. *PLoS Biol.*, 7(6):e1000137, 2009.
- [153] N. OLIVIER, D. KELLER, P. GÖNCZY et Suliana MANLEY : Resolution Doubling in 3D-STORM Imaging through Improved Buffers. *PLoS ONE*, 8(7):e69004, 2013.
- [154] L. NAHIDIAZAR, A.V. AGRONSKAIA, J. BROERTJES, B. van den BROEK et K. JALINK : Optimizing imaging conditions for demanding multi-color super resolution localization microscopy. *PLoS ONE*, 11(7):e0158884, 2016.
- [155] S.A. JONES, S. SHIM, J. HE et X. ZHUANG : Fast, three-dimensional super-resolution imaging of live cells. *Nature Methods*, 8:499–505, 2011.
- [156] S. van de LINDE, S. WOLTER, M. HEILEMANN et M. SAUER : The effect of photo-switching kinetics and labeling densities on super-resolution fluorescence imaging. *J. Biotechnol.*, 149(4):260–266, 2010.
- [157] M. MOLAEI et J. SHENG : Imaging bacterial 3d motion using digital in-line holographic microscopy and correlation-based de-noising algorithm. *Opt. Express.*, 22(26):32119–32137, 2014.

- [158] N. PAVILLON, A. BENKE, D. BOSS, C. MORATAL, J. KÜHN, P. JOURDAIN, C. DEPEUR-SINGE, P.J. MAGISTRETTI et P. MARQUET : Cell morphology and intracellular ionic homeostasis explored with a multimodal approach combining epifluorescence and digital holographic microscopy. *J. Biophotonics*, 3(7):432–436, 2010.
- [159] A.KUŚ, M. DUDEK, B. KEMPER, M KUJAWIŃSKA et A VOLLMER : Tomographic phase microscopy of living three-dimensional cell cultures. *J. of Biomedical Optics*, 19(4): 046009, 2014.
- [160] M.G. GUSTAFSSON, L. SHAO, P.M. CARLTON, C.J. WANG, I.N. GOLUBOVSKAYA, W.Z. CANDE, D.A. AGARD et J.W. SEDAT : Three-dimensional resolution doubling in wide-field fluorescence microscopy by structured illumination. *Biophys. J.*, 94(12):4957–4970, 2008.
- [161] L. SHAO : MICROSCOPY MATTERS Insights from the Advanced Imaging Center at Janelia : Structured-Illumination Microscopy : What types of samples are not suitable and why. <http://aicblog.janelia.org/?p=264>, 2014.
- [162] E.H. REGO, L. SHAO, J.J. MACKLIN, L. WINOTO, G.A. JOHANSSON, N. KAMPS-HUGHES, M.W. DAVIDSON et M.G.L. GUSTAFSSON : Nonlinear structured-illumination microscopy with a photoswitchable protein reveals cellular structures at 50-nm resolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 109(3):E135–E143, 2012.
- [163] L. SONG, H. LU-WALTHER, R. FÖRSTER, A. JOST, M. KIELHORN, J. ZHOU et R. HEINTZMANN : Fast structured illumination microscopy using rolling shutter cameras. *Measurement Science and Technology*, 27(5):055401, 2016.
- [164] H. DEHEZ, M. PICHÉ et Y. De KONINCK : Enhanced resolution in two-photon imaging using a  $TM_{01}$  laser beam at a dielectric interface. *Opt. Lett.*, 34(23):3601–3603, 2009.
- [165] B.G. WILHELM, S. MANDAD, S. TRUCKENBRODT, K. KRÖHNERT, C. SCHÄFER, B. RAMMNER, S.J. KOO, G.A. CLASSEN, M. KRAUSS, V. HAUCKE, H. URLAUB et S.O. RIZZOLI : Composition of isolated synaptic boutons reveals the amounts of vesicle trafficking proteins. *Science*, 344(6187):1023–1028, 2014.
- [166] C. LI, R.K. PASTILA, C. PITSILLIDES, J.M. RUNNELS, M. PUORIS’HAAG, D. CÔTÉ et C.P. LIN : Imaging leukocyte trafficking in vivo with two-photon-excited endogenous tryptophan fluorescence. *Opt. Express*, 18(2):988–999, 2010.
- [167] K. XU et G. Zhong X. ZHUANG : Actin, spectrin, and associated proteins form a periodic cytoskeletal structure in axons. *Science*, 339(6118):452–456, 2013.
- [168] K.B. RAJESHA, N. Veerabagu SURESHB, P.M. ANBARASANC, K. GOKULAKRISHNANB et G. MAHADEVAND : Tight focusing of double ring shaped radially polarized beam with high NA lens axicon. *Optics & Laser Technology*, 43(7):1037–1040, 2011.

- [169] H. DEHEZ, A. APRIL et M. PICHÉ : Needles of longitudinally polarized light : guidelines for minimum spot size, and tunable axial extent. *Opt. Express*, 20(14):14891–14905, 2012.
- [170] G. MILIONE, A. DUDLEY, T.A. NGUYEN, O. CHAKRABORTY, E. KARIMI, A. FORBES et R.R. ALFANO : Measuring the self-healing of the spatially inhomogeneous states of polarization of vector Bessel beams. *J. Optics*, 17(3):035617, 2015.
- [171] F.O. FAHRBACH, P. SIMON et A. RÖHRBACH : Microscopy with self-reconstructing beams. *Nature Photonics*, 4:780–785, September 2010.
- [172] T.A. PLANCHON, L. GAO, D.E. MILKIE, M.W. DAVIDSON, J.A. GALBRAITH, C.G. GALBRAITH et E. BETZIG : Rapid three-dimensional isotropic imaging of living cells using Bessel beam plane illumination. *Nature Methods*, 8(5):417–426, 2011.
- [173] M. ZHAO, H. ZHANG, Y. LI, A. ASHOK, R. LIANG, W. ZHOU et L. PENG : Cellular imaging of deep organ using two-photon Bessel light-sheet nonlinear structured illumination microscopy. *Biomedical Optics Express*, 5(5):1296–1308, 2014.
- [174] G. THÉRIAULT, Y. De KONINCK et N. MCCARTHY : Extended depth of field microscopy for rapid volumetric two-photon imaging. *Opt. Express*, 21(8):10095–10104, 2013.
- [175] G. THERIAULT, M. COTTET, A. CASTONGUAY, N. MCCARTHY et Y. De KONINCK : Extended two-photon microscopy in live samples with Bessel beams : steadier focus, faster volume scans, and simpler stereoscopic imaging. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 8(139), Mai 2014.
- [176] P. DUFOUR, M. PICHÉ, Y. De KONINCK et Nathalie MCCARTHY : Two-photon excitation fluorescence microscopy with a high depth of field using an axicon. *Appl. Opt.*, 45(36):9246–9252, 2006.
- [177] S. IPPONJIMA, T. HIBI, Y. KOZAWA, H. HORANAI, H. YOKOYAMA, S. SATO et T. NEMOTO : Improvement of lateral resolution and extension of depth of field in two-photon microscopy by a higher-order radially polarized beam. *Microscopy*, 63(1):23–32, 2014.
- [178] J. ARLT, V. GARCÉS-CHAVEZ, W. SIBBETT et K. DHOLAKIA : Optical micromanipulation using a Bessel light beam. *Opt. Commun.*, 197(4-6):239–245, 2001.
- [179] W. YU, Z. JI, X. YANG, Z. GONG, Y. XIAO, P. XI et K. SHI : STED Imaging by Using Hollow Bessel Beam. In *Frontiers in Optics 2015*, page FTu3D.6. Optical Society of America, 2015.
- [180] P. ZHANG, P.M. GOODWIN et J. H. WERNER : Fast, super resolution imaging via Bessel-beam stimulated emission depletion microscopy. *Opt. Express*, 22(10):12398–12409, 2014.
- [181] Y. KOZAWA et S. SATO : Sharper focal spot formed by higher-order radially polarized laser beams. *J. Opt. Soc. Am. A*, 24(6):1793–1798, 2007.

- [182] Y. KOZAWA, T. HIBI, A. SATO, H. HORANAI, M. KURIHARA, N. HASHIMOTO, H. YOKOYAMA, T. NEMOTO et S. SATO : Lateral resolution enhancement of laser scanning microscopy by a higher-order radially polarized mode beam. *Opt. Express*, 72(6):15947–15954, 2011.
- [183] J. KIM, D.C. KIM et S.H. BACK : Demonstration of high lateral resolution in laser confocal microscopy using annular and radially polarized light. *Microscopy Research and Technique*, 19(17):441–446, 2011.
- [184] Y. KOZAWA et S. SATO : Numerical analysis of resolution enhancement in laser scanning microscopy using a radially polarized beam. *Opt. Express*, 23(3):2076–2084, 2015.
- [185] B. RICHARDS et E. WOLF : Electromagnetic diffraction in optical systems. 2. structure of the image field in an aplanatic system. *Proc. R. Soc. A*, 253(1274):358–379, 1959.
- [186] C. VARIN, M. PICHÉ et M.A. PORRAS : Analytical calculation of the longitudinal electric field resulting from the tight focusing of an ultrafast transverse-magnetic laser beam. *J. Opt. Soc. Am. A*, 23(8):2027–2038, 2006.
- [187] A. APRIL : Nonparaxial elegant Laguerre–Gaussian beams. *Opt. Lett.*, 33(12):1392–1394, 2008.
- [188] A. APRIL : Nonparaxial TM and TE beams in free space. *Opt. Lett.*, 33(14):1563–1565, 2008.
- [189] L. NOVOTNY et B. HECHT : *Principles of Nano-Optics*. Cambridge University Press, 2006.
- [190] I.S. GRADSHTEIN, I. M. RYZHIK et A. JEFFREY : *Table of Integrals, Series, and Products*. Academic Press, New York, 1980.
- [191] J.D. JACKSON : *Classical Electrodynamics*. Wiley, New York, 1998.
- [192] J.H. MCLEOD : The axicon : A new type of optical element. *J. Opt. Soc. Am.*, 44(8):592–597, 1954.
- [193] Arcoptix SWITZERLAND : Radial/aximuthal polarisation converter. [http://www.arcoptix.com/radial\\_polarization\\_converter.htm](http://www.arcoptix.com/radial_polarization_converter.htm), 2017.
- [194] W.T. WELFORD : Use of annular apertures to increase focal depth. *J. Opt. Soc. Am.*, 50(8):749–752, 1960.
- [195] X. ZENG et F. WU : Effect of elliptical manufacture error of an axicon on the diffraction-free beam patterns. *Opt. Eng.*, 47(8):083401, 2008.
- [196] R. ARIMOTO, C. SALOMA, T. TANAKA et S. KAWATA : Imaging properties of axicon in a scanning optical system. *Appl. Opt.*, 31(31):6653–6657, 1992.

- [197] G. THÉRIAULT : *Développement d'un microscope à grande profondeur de champ pour l'imagerie fonctionnelle de neurones dans des échantillons épais*. Thèse de doctorat, Université Laval, 2014.
- [198] L.E. LORENZO, A.G. GODIN, F. WANG, M. ST-LOUIS, S. CARBONETTO, P.W. WISEMAN, A. Ribeiro da SILVA et Y. De KONINCK : Gephyrin Clusters Are Absent from Small Diameter Primary Afferent Terminals Despite the Presence of GABAA Receptors. *J. Neuroscience*, 34(24):8300—8317, 2014.
- [199] R.C. GONZALEZ et R.E. WOODS : *Digital Image Processing*. Pearson Education Inc, 2008.
- [200] P. ZHANG, M.E. PHIPPS, P M. GOODWIN et J.H. WERNER : Confocal line scanning of a Bessel beam for fast 3D imaging. *Opt. Lett.*, 39(12):3682–3685, 2014.
- [201] S. HEUKE, F.B. LEGESSE, D. AKIMOV, U. HUBNER, J. DELLITH, M. SCHMITT et J. POPP : Bessel beam coherent anti-Stokes Raman scattering microscopy. *J. Opt. Soc. Am. B*, 32(9):1773–1779, 2015.
- [202] K. KOROBCEVSKAYA, C. PERES, Z. LI, A. ANTIPOV, C.J.R. SHEPPARD, A. DIASPRO, et P. BIANCHINI : Intensity weighted subtraction microscopy approach for image contrast and resolution enhancement. *Sci. Rep.*, 6:25816, 2016.
- [203] N. WIENER : *The Interpolation, Extrapolation and Smoothing of Stationary Time Series*. J Wiley and Sons, New York, 1949.
- [204] E. THIEBAUT : Introduction to image reconstruction and inverse problems. *Optics in Astrophysics*, 2005.
- [205] F. ORIEUX : *Inversion bayésienne myope et non-supervisée pour l'imagerie sur-résolue. Application à l'instrument SPIRE de l'observatoire spatial Herschel*. Thèse de doctorat, Université Paris-sud 11, 2009.
- [206] A.N. TIKHONOV : On the stability of inverse problems. *Dokl. Akad. Nauk SSSR*, 39(5):195–198, 1943.
- [207] J. NOCEDAL et S.J. WRIGHT : *Numerical Optimization*. Springer Series in Operations Research, 1999.
- [208] E. THIEBAUT : Optimization issues in blind deconvolution algorithms. *Proc. SPIE : Astronomical Data Analysis II*, 4847:174–183, Dec 2002.
- [209] B.E.A. SALEH et M.C. TEICH : *Fundamentals of Photonics*. Wiley Series in Pure and Applied Optics. Wiley Online, 2001.
- [210] N. KAYA, J. STROHABER, A. A. KOLOMENSKII, G. KAYA, H. SCHROEDER et H.A. SCHUESSLER : White-light generation using spatially-structured beams of femtosecond radiation. *Opt. Lett.*, 20(12):13337–13346, 2012.

- [211] S.C. CHU, Y.T. CHEN, K.F. TSAI et K. OTSUKA : Generation of high-order Hermite-Gaussian modes in end-pumped solid-state lasers for square vortex array laser beam generation. *Opt. Express*, 20:7128–7141, 2012.
- [212] L. THIBON, L.E. LORENZO, M. PICHÉ, et Y.D. KONINCK : Resolution enhancement in confocal microscopy using Bessel-Gauss beams. *Opt. Express*, 25(3):2162–2177, 2017.
- [213] E. SEZGIN : Super-resolution optical microscopy for studying membrane structure and dynamics. *J. Phys. : Condensed Matter*, 29(27):273001, 2017.
- [214] M. HOFMANN, C. EGGELING, S. JAKOBS et S.W. HELL : Breaking the diffraction barrier in fluorescence microscopy at low light intensities by using reversibly photoswitchable proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 102(49):17565–17569, 2005.
- [215] J.G. DANZL, S.C. SIDENSTEIN, C. GREGOR, N.T. URBAN, P. ILGEN, S. JAKOBS et S.W. HELL : Coordinate-targeted fluorescence nanoscopy with multiple off states. *Nature Photonics*, 10:122–128, 2016.
- [216] G. VICIDOMINI, G. MONERON, K.Y. HAN, V. WESTPHAL, H. TA, M. REUSS, J. ENGELHARDT, C. EGGELING et S.W. HELL : Sharper low-power STED nanoscopy by time gating. *Nature Methods*, 8:571–573, 2011.
- [217] T. GROTJOHANN, I. TESTA, M. LEUTENEGGER, H. BOCK, N.T. URBAN, F.LAVOIE-CARDINAL, K.I. WILLIG, C. EGGELING, S. JAKOBS et S.W. HELL : Diffraction-unlimited all-optical imaging and writing with a photochromic GFP. *Nature*, 478:204–208, 2011.
- [218] P.A. PELLETT, X. SUN, T.J. GOULD, J.E. ROTHMAN, M.Q. XU, I.R. CORRÊA et J. BEWERSDORF : Two-color STED microscopy in living cells. *Biomed. Opt. Express*, 2(8):2364–2371, 2011.
- [219] F.R. WINTER, M. LOIDOLT, V. WESTPHAL, A.N. BUTKEVICH, C. GREGOR, S.J. SAHL et S.W. HELL : Multicolour nanoscopy of fixed and living cells with a single STED beam and hyperspectral detection. *Sci. Rep.*, 7(46492), 2017.
- [220] J. MIN, C. VONESCH, H. KIRSHNER, L. CARLINI, N. OLIVIER, S. HOLDEN, S. MANLEY, J.C. YE et M. UNSER : Falcon : fast and unbiased reconstruction of high-density super-resolution microscopy data. *Sci. Rep.*, 4(4577), 2014.
- [221] E.H. REGO, L. SHAO, J.J. MACKLIN, L. WINOTO, G.A. JOHANSSON, N. KAMPS-HUGHES, M.W DAVIDSON et M.G. GUSTAFSSON : Nonlinear structured-illumination microscopy with a photoswitchable protein reveals cellular structures at 50-nm resolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 109(3):E135–E143, 2014.
- [222] O. SCHULZA, C. PIEPERA, M. CLEVERC, J. PFAFFD, A. RUHLANDTE, R.H. KEHLENBACHD, F.S. WOUTERSB, J. GROSSHANS, G. BUNTB et J. ENDERLEINA : Resolution doubling in fluorescence microscopy with confocal spinning-disk image scanning microscopy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 110(52):21000–21005, 2013.

- [223] A. SONG, A.S. CHARLES, S.A. KOAY, J.L. GAUTHIER, S.Y. THIBERGE, J.W. PILLOW et D.W. TANK : Volumetric two-photon imaging of neurons using stereoscopy (vtwins). *Nature Methods*, 14:420–426, 2017.
- [224] J. FESSLER : Chapter 3 analytical tomographic image reconstruction methods. <http://web.eecs.umich.edu/~fessler/book/>, 2017.
- [225] J. FESSLER : Chapter 4 properties of analytical tomographic image reconstruction. <http://web.eecs.umich.edu/~fessler/book/>, 2017.
- [226] R.E. HENKIN, A. ALESSIO et P. KINAHAN : *PET Image Reconstruction in Nuclear medicine, Volume 2*. Mosby Elsevier, 2006.
- [227] F. MOMEY : *Reconstruction en tomographie dynamique par approche inverse sans compensation de mouvement*. Thèse de doctorat, Université Jean Monnet - Saint-Etienne, 2013.
- [228] J. RADON : Über die bestimmung von funktionen durch ihre integralwerte längs gewisser mannigfaltigkeiten. *Berichte über die Verhandlungen der Königlich-Sächsischen Akademie der Wissenschaften zu Leipzig, Mathematisch-Physische Klasse*, 69:262–277, 1917.
- [229] M. LYRA et A. PLOUSSI : Filtering in SPECT Image Reconstruction. *International J. Biomedical Imaging*, 2011(693795):14, 2011.
- [230] P.P. BRUYANT : Analytic and Iterative Reconstruction Algorithms in SPECT. *J. Nucl. Med.*, 43(10):1343–1358, 2002.
- [231] S.W. SMITH : *The Scientist and Engineer's Guide to Digital Signal Processing, chap. 25*. California Technical Publishing, San Diego, California, 1997.
- [232] L.A. SHEPP et Y. VARDI : Maximum likelihood reconstruction for emission tomography. *IEEE Transactions on Medical Imaging*, 1(2):113–122, 1982.
- [233] H.M. HUDSON et R.S. LARKIN : Accelerated image reconstruction using ordered subsets of projection data. *IEEE Transactions on Medical Imaging*, 13(4):601–609, 1994.
- [234] L. CAUCCI, W.C.J. HUNTER, L.R. FURENLID et H.H. BARRETT : List-mode MLEM Image Reconstruction from 3D ML Position Estimates. *IEEE Nucl. Sci. Symp. Conf. Rec.*, page 2643–2647, 1997.
- [235] A.J. READER, K. ERLANDSSON, M.A. FLOWER et R.J. OTT : Fast accurate iterative reconstruction for low-statistics positron volume imaging. *Phys. Med. Biol.*, 43(4):835–846, 1998.
- [236] L. PARRA et H.H. BARRETT : List-mode likelihood : EM algorithm and image quality estimation demonstrated on 2-D PET. *IEEE Transactions on Medical Imaging*, 17(2): 228–235, 1998.

- [237] R.M. LEWITT et S. MATEJ : Overview of methods for image reconstruction from projections in emission computed tomography. *Proc. IEEE*, 91(10):1588 – 1611, 2003.
- [238] J. CUI, G. PRATX, B. MENG et C.S. LEVIN : Distributed MLEM : An Iterative Tomographic Image Reconstruction Algorithm for Distributed Memory Architectures. *IEEE Transactions on Medical Imaging*, 32(5):957 – 967, 2013.
- [239] L.B. LUCY : An iterative technique for the rectification of observed distributions. *Astronomical Journal*, 79:745, 1974.
- [240] W.H. RICHARDSON : Bayesian-based iterative method of image restoration. *J. Opt. Soc. Am.*, 62(1):55–59, 1972.
- [241] D.A. FISH, A.M. BRINICOMBE, E.R. PIKE et J.G. WALKER : Blind deconvolution by means of the Richardson–Lucy algorithm. *J. Opt. Soc. Am. A*, 12(1):58–65, 1995.
- [242] D. WENDE, F. HUAJUN, X. ZHIHAI et L. QI : A piecewise local regularized Richardson–Lucy algorithm for remote sensing image deconvolution. *Optics and Laser Technology*, 43(5):926–933, 2011.
- [243] M. LAASMAA, M. VENDELIN et P. PETERSON : Application of regularized Richardson–Lucy algorithm for deconvolution of confocal microscopy images. *J. Microscopy*, 243(2):124–140, 2011.
- [244] H. LIU, Z. ZHANG, S. LIU, T. LIU, L. YAN et T. ZHANGN : Richardson–Lucy blind deconvolution of spectroscopic data with wavelet regularization. *Appl. Opt.*, 54(7):1770–1775, 2015.