





UNIVERSITÉ DE SHERBROOKE  
Faculté de génie  
Département de génie électrique et de génie informatique

Amélioration de la résolution latérale en  
microscopie SPR/MCWG par reconstruction  
d'images

Mémoire de maîtrise  
Spécialité : génie électrique

Frédéric A. BANVILLE

Jury : Paul G. CHARETTE (directeur)  
Michael CANVA (externe)  
Maxime DESCOTEAUX  
Michel GRANDBOIS (rapporteur)



# RÉSUMÉ

Les recherches pharmacologiques nécessitent des outils d'analyse capables de caractériser et d'étudier des structures ou phénomènes biologiques. Une plate-forme de microscopie exploitant la résonance de plasmons de surface permet de faire l'acquisition d'images étudiant des phénomènes au niveau de cellules individuelles. Les images acquises par ce type de plate-forme présentent la variation d'indice de réfraction du milieu observé en couplant une lumière incidente aux plasmons de surface à l'interface d'un métal et d'un diélectrique. La faible résolution latérale de ces images ne permet cependant pas d'en distinguer tous les détails. Cette limite de résolution est associée aux propriétés de l'onde de surface qui entraînent une dégradation de l'image par l'étalement directionnel de l'information sur plusieurs pixels. De nombreux groupes de recherche ont travaillé sur ce problème de résolution en explorant des alternatives matérielles, que ce soit au niveau du montage d'acquisition ou des échantillons. Cependant, ceux-ci ont dû faire certains compromis afin d'améliorer la résolution latérale occasionnant une limitation en résolution temporelle ou en indice de réfraction. L'approche préférée dans ce projet de maîtrise est l'utilisation de techniques de post-traitement des images (déconvolution, algorithme de reconstruction d'images) acquises par le système de microscopie. Cette approche permet de conserver un bon contraste dans les images acquises et une bonne résolution temporelle.

Ce projet vise à améliorer la résolution latérale en microscopie de résonance de plasmons de surface (SPR) en utilisant un algorithme de reconstruction d'images. Une méthode comme celle-ci n'a jamais été exploitée pour résoudre ce problème de limitation en résolution. Dans ce projet, une image de meilleure résolution est obtenue en combinant l'information pertinente de plusieurs images où la direction d'excitation des plasmons de surface diffère. Ces images sont acquises à partir d'échantillons de guides d'ondes à gaine métallique (MCWG) dont les matériaux et structures sont connus. Ceux-ci sont composés de quatre couches et ont tout d'abord été fabriqués. Ces échantillons ont permis l'acquisition d'images de structures dont les dimensions et les paramètres sont connus. Un algorithme de restauration d'images a été développé et implémenté pour retirer la dégradation linéaire observée dans les images de microscopie SPR acquises. Celui-ci détermine l'information nécessaire à l'exécution de l'algorithme à partir des images acquises, et améliore la résolution en microscopie SPR par une opération logicielle ne faisant pas de compromis au niveau matériel. L'algorithme a été validé auprès des échantillons MCWG dont la couche diélectrique est composée de structures synthétiques ou de cellules biologiques. Une amélioration de 6 à 1  $\mu m$  sur structures synthétiques a été démontrée, tandis que le traitement permet de distinguer des détails des images cellulaires qui n'étaient pas identifiables avant. Ainsi, grâce à cette amélioration de la résolution, l'application de cet algorithme facilitera l'étude et le développement de nouveaux médicaments pharmacologiques.

**Mots-clés :** Résonance de plasmons de surface (SPR), microscopie, guide d'onde à gaine métallique (MCWG), reconstruction d'images, biodétection, résolution latérale



# TABLE DES MATIÈRES

|          |  |           |
|----------|--|-----------|
| <b>1</b> | <b>INTRODUCTION</b>  | <b>1</b>  |
| 1.1      | Mise en contexte et problématique . . . . .  | 1         |
| 1.2      | Définition du projet de recherche . . . . .  | 2         |
| 1.3      | Objectifs du projet de recherche . . . . .   | 2         |
| 1.4      | Plan du document et contributions originales . . . . .                                 | 3         |
| <b>2</b> | <b>ÉTAT DE L'ART ET CADRE DE RÉFÉRENCE</b>   | <b>5</b>  |
| 2.1      | Résonance de plasmons de surface . . . . .   | 5         |
| 2.2      | Biodétection . . . . .   | 7         |
| 2.3      | Microscopie SPR . . . . .  | 10        |
| 2.3.1    | Techniques expérimentales . . . . .  | 12        |
| 2.3.2    | Applications . . . . .   | 15        |
| 2.3.3    | Guides d'ondes à gaine métallique . . . . .  | 16        |
| 2.3.4    | Amélioration de la résolution latérale . . . . .                                       | 17        |
| 2.4      | Post-traitement des images . . . . .   | 21        |
| <b>3</b> | <b>ESTIMATION DES PARAMÈTRES ET FABRICATION DE SUBSTRATS</b>                           | <b>25</b> |
| 3.1      | Identification des paramètres . . . . .  | 25        |
| 3.2      | Estimation des indices de réfraction inconnus . . . . .                                | 26        |
| 3.3      | Fabrication des échantillons . . . . .   | 27        |
| <b>4</b> | <b>ALGORITHME DE RESTAURATION DÉVELOPPÉ ET RÉSULTATS SUR ÉCHANTILLONS SYNTHÉTIQUES</b> | <b>31</b> |
| 4.1      | Article . . . . .  | 33        |
| <b>5</b> | <b>RÉSULTATS SUR ÉCHANTILLONS CELLULAIRES</b>  | <b>41</b> |
| 5.1      | Comparaison du milieu cellulaire . . . . .   | 41        |
| 5.2      | Validation sur images cellulaires . . . . .  | 42        |
| <b>6</b> | <b>CONCLUSION</b>  | <b>47</b> |
| 6.1      | Sommaire des travaux et atteinte des objectifs . . . . .                               | 47        |
| 6.2      | Contributions originales des travaux . . . . .   | 48        |
| 6.3      | Perspectives . . . . .   | 49        |
|          | <b>LISTE DES RÉFÉRENCES</b>  | <b>51</b> |





# LISTE DES FIGURES

|      |  |    |
|------|--|----|
| 2.1  | Courbe de dispersion des plasmons de surface et de la lumière. Interface métal (or, indice de réfraction variable selon la longueur d'onde de la lumière incidente) et diélectrique (eau, indice de réfraction $n_d = 1.33$ ). . . . .   | 5  |
| 2.2  | Relation de dispersion des plasmons de surface modifiée par l'ajout d'un prisme à indice de réfraction élevé (BK7, $n_p = 1.515$ ). Interface or/eau. . .  | 6  |
| 2.3  | Configuration Kretschmann. Une onde incidente pénètre un prisme optique d'indice de réfraction élevé et est réfléchié partiellement par réflexion totale interne par une fine couche métallique vers un détecteur. Lorsqu'il y a résonance, la lumière se couple avec les plasmons de surface à l'interface du diélectrique et du métal sous forme d'onde évanescente. . . . .   | 6  |
| 2.4  | Courbe SPR typique. Le cercle de gauche représente l'angle critique de réflexion totale interne et le cercle de droite l'angle de résonance plasmonique.   | 8  |
| 2.5  | Courbe SPR représentant la variation de l'angle de résonance lorsque l'indice de réfraction du milieu ( $n$ ) change. . . . .  | 8  |
| 2.6  | Attache moléculaire à l'interface diélectrique-métal. Ajout de structures à la surface du métal permettant de détecter spécifiquement la présence d'analytes dans le diélectrique. L'attache de ces analytes sur la surface fonctionnalisée change localement l'indice de réfraction effectif du diélectrique mesuré par le système SPR. . . . .   | 9  |
| 2.7  | Différence de contraste en microscopie SPR. A : Lumière incidente couplée avec les plasmons de surface (milieu 1). Lumière réfléchié à la surface (milieu 2), conditions de couplages non-adéquates. B : Contraste défini par la différence d'intensité lumineuse recueillie par le détecteur à l'angle de résonance du milieu 1 ( $\theta$ ). . . . .   | 10 |
| 2.8  | Impact de la longueur de propagation des plasmons de surface sur la résolution latérale. Figure adaptée de [Giebel <i>et al.</i> , 1999]. Les plasmons sont excités de gauche vers la droite et se propagent sur une distance supérieure à la distance entre les carrés rendant indistinguables le réseau. . . . .   | 11 |
| 2.9  | Représentation de la zone d'utilisation de l'objectif à grande ouverture numérique. Un masque est utilisé dans la figure <i>a</i> pour exciter les plasmons de surfaces qu'à des angles supérieurs à l'angle critique de réflexion totale interne. La figure <i>b</i> présente la zone utile du microscope permettant d'exciter les plasmons de surface. Celle-ci est délimitée par l'indice de réfraction du diélectrique et l'ouverture numérique de l'objectif. . . . . | 12 |
| 2.10 | Point de focalisation du faisceau sur le plan focal arrière de l'objectif de microscope modifie l'angle d'incidence du faisceau collimaté sur l'échantillon. Balayage angulaire de l'échantillon disponible en modifiant le point de focalisation du faisceau sur l'axe. . . . .   | 13 |
| 2.11 | Montage pour imagerie SPR basé sur un objectif à haut ouverture numérique et un faisceau d'excitation collimaté [Chabot, 2013]. . . . .  | 14 |

|      |   |    |
|------|---|----|
| 2.12 | Imagerie SPR utilisant un objectif à haute ouverture numérique [Wang <i>et al.</i> , 2012]. Méthode permettant la microscopie SPR ou l'épifluorescence.   | 15 |
| 2.13 | Courbes de réflectance d'un MCWG (gauche) et de SPR classique (droite). Une variation de l'indice de réfraction du milieu d'analyse de 0.003 entraîne un décalage vers la droite des courbes de réflectance. Les cercles présents sur les courbes représentent la différence d'intensité lumineuse observée par le capteur à un même angle [Skivesen <i>et al.</i> , 2007]. . . . .   | 16 |
| 2.14 | Modélisation de l'intensité lumineuse réfléchie lorsque les plasmons de surface traversent des transitions abruptes d'indice de réfraction : zone fortement couplée à faiblement couplée (I1), zone faiblement couplée à fortement couplée (I2) et aucune variation d'indice (I3) [Yeatman, 1996]. . . . .  | 18 |
| 2.15 | Image A obtenue par contraste de phase présentant bien les contours de la cellule. Il y a perte d'information lorsque la cellule est imagée par microscopie SPR [Giebel <i>et al.</i> , 1999]. Les zones numérotées et les points d'attache de la cellule ne sont plus aussi définis. . . . .   | 19 |
| 2.16 | Représentation de l'interférence des plasmons de surface à l'interface de l'échantillon lorsque le point de focalisation varie [Somekh <i>et al.</i> , 2000]. . .   | 20 |
| 2.17 | A et B : Images d'un caméraman transformées par un flou de mouvement de directions différentes. C et D : Déconvolution avec respectivement une et deux images. Figure issue de [Rav-Acha et Peleg, 2005]. . . . .   | 22 |
| 3.1  | Calcul de l'indice de réfraction d'un milieu inconnu à partir des franges d'interférence (zone encerclée verte) présentes dans l'image acquise. Zone fortement couplée : Air ( $n_{air} = 1$ ). Zone faiblement couplée : PDMS ( $n_{PDMS} = 1.4$ ). . . . .  | 27 |
| 3.2  | Échantillons fabriqués où seulement la couche de diélectrique est différente. Type 1 : structures synthétiques (air et PDMS). Type 2 : Cellules biologiques fixées (cellules et air). . . . .   | 28 |
| 4.1  | (a) Reflectivity image from a sample consisting of a PDMS film with a rectangular cutout atop a MCWG substrate, in air. The illumination is tuned to couple to air (dark rectangle). The direction of mode propagation is horizontally from the left in the image; (b) TOP : normalized reflected intensity along the dotted line in the image; (b) BOTTOM : corresponding model estimation from Eq. (4.3) for $x < 100 \mu m$ and from Eq. (4.5) for $x > 100 \mu m$ . . . . .                           | 38 |
| 4.2  | TOP : block diagram showing the sequence of operations in the proposed method (registration, filtering, square root, minimization, and square); BOTTOM : graphs showing the result of each operation on a line taken from two input images with counterpropagating modes. In the upper three plots, the direction of mode propagation is from right to left. In lower three plots, the direction of mode propagation is from right to left. The rightmost plot shows the result of the algorithm. . . . . | 39 |

|     |  |    |
|-----|--|----|
| 4.3 | LEFT (a)-(d) : input image data set from a typical experiment where the sample is a cross-shaped cut-out in the PDMS layer atop the MCWG ; TOP RIGHT : Resulting synthesized image with improved lateral resolution after 25 iterations of Eq. (4.1) ; BOTTOM RIGHT : intensity profile along the dotted line in the input (a) and final (e) images. . . . .               | 40 |
| 5.1 | A : Contraste entre une cellule et l'eau. B : Profil d'intensité (ligne pointillée dans 5.1A). C : Contraste entre cellules et l'air. D : Profil d'intensité (ligne pointillée dans 5.1C). Contraste plus élevé pour des cellules fixées dans l'air (air : 1, milieu cellulaire : $\sim 1.33$ , cellules : $\sim 1.38$ ). Échelle : $25 \mu m$ . . . . .                   | 42 |
| 5.2 | Échantillons de structures cellulaires. Directions de propagation différentes : $0^\circ$ (A), $90^\circ$ (B), $180^\circ$ (C) et $270^\circ$ (D). Encadrés rouges : détails différents selon l'orientation de la propagation de l'onde de surface. Échelle : $25 \mu m$ . . . . .   | 43 |
| 5.3 | Agrandissement de cellules présentées à la figure 5.2 (Encadrés rouges. A : figure 5.2A, B : figure 5.2D). Lignes rouges : contours actifs géodésiques. Coutours en B ne permettent pas d'identifier la cellule. Échelle : $25 \mu m$ . . . . .  | 43 |
| 5.4 | A : image initiale, B : oscillation de la membrane cellulaire filtrée, C : oscillation du noyau filtrée, D : profil d'intensité (lignes pointillées) entre l'image acquise (A) et l'image filtrée finale (C). Une atténuation de l'oscillation haute fréquence est observable. Échelle : $25 \mu m$ . . . . .  | 44 |
| 5.5 | A : Image acquise. B : Image finale obtenue à l'aide de l'algorithme de restauration. Structures cellulaires partiellement reconstruite. Présence d'artefacts causés par des impuretés de la couche KMPR. Zones d'intensité lumineuse intense causent également des artefacts. Encadrés rouges : agrandissements présentés à la figure 5.6. Échelle : $25 \mu m$ . . . . . | 45 |
| 5.6 | Agrandissements de la figure 5.5 où certains détails ont été restaurés. Le noyau est identifiable en B, tandis qu'il est confondu avec les oscillations en A. Cercle vert : Artefacts créés par la restauration d'images. Échelle : $25 \mu m$ . . . . .   | 45 |



# CHAPITRE 1

## INTRODUCTION

### 1.1 Mise en contexte et problématique

La biologie et la pharmacologie sont à la base des recherches s'intéressant au développement de nouveaux médicaments. Pour ce faire, les groupes de recherche dans ce domaine étudient entre autres les comportements cellulaires [Bousse, 1996], la cinétique de liaison de biomolécules [Campbell et Kim, 2007] et la morphologie de différentes biomolécules [Chabot *et al.*, 2009]. Afin de faciliter et d'accélérer ces analyses, plusieurs outils de recherche sont développés, par exemple des instruments offrant une détection basée sur l'interaction entre la lumière et les biomolécules.

Une technique utilisée est la résonance de plasmons de surface (SPR), où il est possible d'observer des variations d'indice de réfraction à la surface d'un métal et/ou d'épaisseur du matériau déposée [Homola, 2008]. Cette méthode d'analyse peut être utilisée en microscopie et permet d'observer ces variations à plus petite échelle, et ainsi d'étudier des phénomènes au niveau de cellules individuelles sans nécessiter l'ajout d'agents de marquage. De plus, la microscopie SPR offre un fort contraste en imagerie cellulaire à la différence de la microscopie optique, et permet l'observation de phénomènes de surface comparativement à la microscopie optique et l'épifluorescence où l'information recueillie est de volume.

Cependant, la microscopie SPR offre des images dont la résolution latérale (distance minimale pour discerner deux détails) est souvent limitative. En effet, la SPR est basée sur la propagation d'une onde de surface à l'interface du métal de l'échantillon et du milieu diélectrique à étudier lorsqu'il y a résonance entre l'onde électromagnétique incidente et les plasmons de surface (définis à la section 2.1). Dans la direction de la propagation de l'onde, la résolution est définie par la distance sur laquelle l'onde se propage avant d'être totalement absorbée et peut atteindre plusieurs dizaines de micromètres [Giebel *et al.*, 1999], tandis que dans la direction perpendiculaire, la résolution est de l'ordre de la diffraction de la lumière comme en microscopie optique (centaines de nanomètres). La résolution en microscopie SPR peut être un facteur limitant lorsque les structures d'intérêt sont de dimensions plus petites que la distance de la propagation de l'onde de surface. Par conséquent, pour certains matériaux employés, il est impossible de distinguer des détails

inférieurs à plusieurs dizaines de micromètres. Par exemple, le corps d'une cellule mesure entre 10 et 30  $\mu m$ , tandis que son noyau entre 1 et 15  $\mu m$  [Nature Education, 2014].

Plusieurs alternatives sont explorées dans la littérature pour améliorer la résolution latérale en microscopie SPR. Ces différentes approches se situent au niveau matériel, c'est-à-dire à la méthode d'acquisition, plutôt qu'aux données recueillies, et ce, aux dépens de la résolution temporelle ou d'indice de réfraction.

## 1.2 Définition du projet de recherche

L'approche préférée par ce projet de recherche propose de faire un minimum de compromis pour améliorer la résolution latérale en microscopie SPR en combinant des images où la direction de propagation de l'onde de surface est différente. La dégradation est assimilée à un flou directionnel causé par un mouvement de la caméra ou de l'objet d'intérêt, et corrigé par un algorithme de reconstruction d'images développé à la base pour ce type d'applications [Rav-Acha et Peleg, 2005].

## 1.3 Objectifs du projet de recherche

Les objectifs du projet sont les suivants :

1. Développement et implémentation d'une procédure de restauration d'images.
  - (a) Contrairement au flou de mouvement, la dégradation des images SPR est non-linéaire et sera estimée à partir de la physique de la propagation des ondes de surface. Une méthode sera développée pour déterminer l'indice de réfraction des différentes zones constituant les images à partir des images acquises, et ainsi pouvoir estimer la dégradation sur des échantillons de constitution inconnue.
  - (b) Les images seront ensuite filtrées pour retirer la non-linéarité du système engendrée par la propagation de l'onde de surface.
  - (c) Finalement, la dégradation estimée précédemment sera déconvoluée des images acquises pour obtenir une image de meilleure résolution.
2. Validation de la procédure sur des structures synthétiques.

La procédure de restauration d'images développée dans ce projet sera validée en l'appliquant à des images de structures synthétiques aux dimensions connues et en comparant le résultat de cette restauration à celui attendu.

### 3. Application à l'imagerie cellulaire.

Des applications avec structures cellulaires seront explorées où l'algorithme de restauration d'images développé et implémenté dans ce projet sera employé pour étudier des phénomènes biologiques survenant à des résolutions inférieures à la distance de propagation de l'onde évanescente.

## 1.4 Plan du document et contributions originales

Six chapitres composent ce mémoire, dont le premier est l'introduction. Le second chapitre détaille l'état de l'art de la résonance de plasmons de surface, de la microscopie SPR, ainsi que les alternatives proposées pour compenser et surpasser la limitation en résolution latérale.

Le chapitre 3 présente tout d'abord l'estimation des paramètres décrivant la dégradation dans les images causée par la propagation de l'onde de surface. Ensuite, la méthode permettant d'identifier les indices de réfraction composant la couche diélectrique d'analyse à partir des images acquises y est décrite. Finalement, une description détaillée de la fabrication des échantillons utilisés dans le projet est présentée.

Un article scientifique publié dans la revue *Optics Letters* est présenté au chapitre 4 et est intitulé « *Improved resolution in SPR and MCWG microscopy by combining images acquired with distinct mode propagation directions* ». Il décrit l'algorithme de restauration d'images développé au cours de ce projet et son application sur des images de structures synthétiques. Le résultat offre des images de meilleure résolution, soit une amélioration de 6 à 1  $\mu m$ .

Le chapitre 5 présente l'application de l'algorithme de restauration d'images sur des échantillons de structures cellulaires. Le dernier chapitre conclut le mémoire en présentant un bilan des travaux effectués, un retour sur les objectifs du projet, ainsi que ses perspectives.





# CHAPITRE 2

## ÉTAT DE L'ART ET CADRE DE RÉFÉRENCE

Ce chapitre présente l'état de l'art des techniques et des aspects scientifiques liés à ce projet de maîtrise. La première section traite de la théorie de la résonance de plasmons de surface (SPR), tandis que la seconde souligne l'utilisation de la SPR pour la biodétection. La troisième section porte sur la microscopie SPR, sujet au coeur du projet, et discute des défis adressés par les groupes de recherche du domaine. La dernière section présente les techniques de post-traitement d'images acquises afin d'atteindre les objectifs du projet.

### 2.1 Résonance de plasmons de surface

Dans cette section, la théorie sur la SPR est issue des travaux de Raether [Raether, 1997]. Les plasmons de surface correspondent aux oscillations des électrons à l'interface d'un métal et d'un diélectrique. La SPR survient lorsqu'une onde électromagnétique incidente entre en résonance avec les plasmons de surface de l'échantillon. La courbe de dispersion de la lumière et des plasmons de surface à une interface métal/diélectrique (par exemple or/eau) permet d'observer les conditions nécessaires pour la résonance (figure 2.1). Celle-ci représente la relation entre la fréquence angulaire et le vecteur d'onde d'une onde.

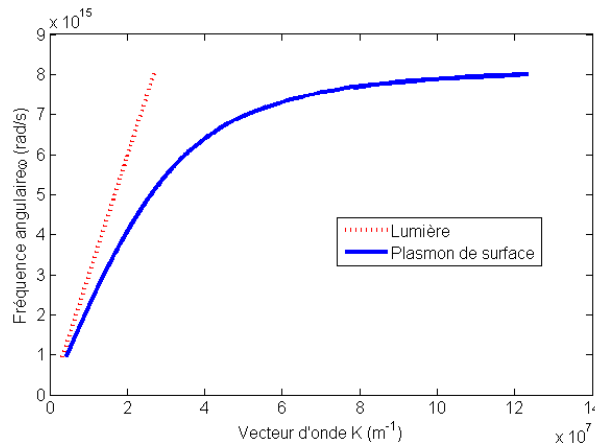


Figure 2.1 Courbe de dispersion des plasmons de surface et de la lumière. Interface métal (or, indice de réfraction variable selon la longueur d'onde de la lumière incidente) et diélectrique (eau, indice de réfraction  $n_d = 1.33$ ).

De plus, la courbe de dispersion dépend de l'indice de réfraction du milieu dans lequel se propage l'onde électromagnétique. L'indice de réfraction correspond au rapport entre la

vitesse de la lumière dans le vide et la vitesse de phase de la lumière dans ce milieu. Afin qu'il y ait couplage entre la lumière et les plasmons de surface, il faut que la courbe de dispersion de la lumière croise celle des plasmons de surface. Dans le cas présenté dans cette figure, il n'y a pas de couplage. Cette situation peut être corrigée par exemple, en ajoutant un prisme sous l'échantillon dont l'indice de réfraction est supérieur à celui du milieu d'intérêt. Celui-ci a pour effet de diminuer la pente de la courbe de dispersion de la lumière pour qu'elle croise celle des plasmons de surface, et ainsi être en conditions de couplage. Par exemple, pour une interface or/eau, une condition de résonance est obtenue en ajoutant un prisme BK7 ( $n_p = 1.515$ ) [Mikhail Polyanskiy, 2012] (figure 2.2).

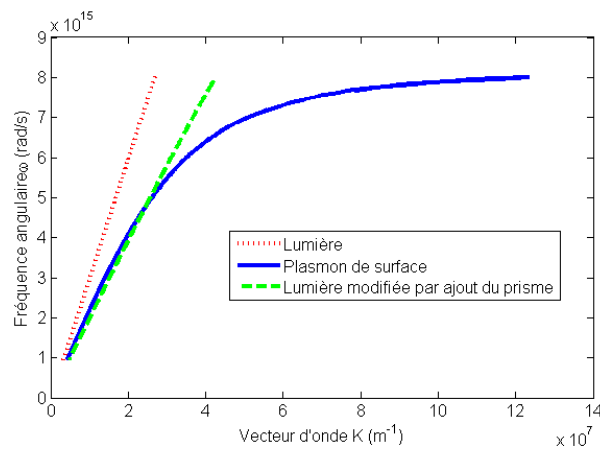


Figure 2.2 Relation de dispersion des plasmons de surface modifiée par l'ajout d'un prisme à indice de réfraction élevé (BK7,  $n_p = 1.515$ ). Interface or/eau.

La configuration pour créer un couplage la plus utilisée est la configuration Kretschmann (prisme/métal/diélectrique) [Raether, 1997, p.11] (figure 2.3).

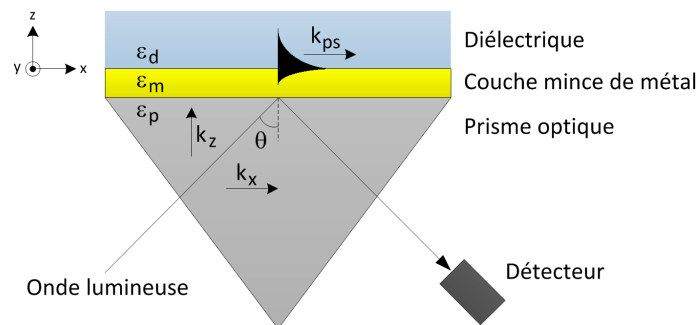


Figure 2.3 Configuration Kretschmann. Une onde incidente pénètre un prisme optique d'indice de réfraction élevé et est réfléchi partiellement par réflexion totale interne par une fine couche métallique vers un détecteur. Lorsqu'il y a une résonance, la lumière se couple avec les plasmons de surface à l'interface du diélectrique et du métal sous forme d'onde évanescente.

L'onde lumineuse incidente pénètre le prisme et est réfléchi sur le métal vers le détecteur. Une portion de cette onde lumineuse pénètre le métal sous forme d'onde évanescente (onde dont l'amplitude diminue exponentiellement). Puis, si la couche de métal est assez mince et que l'angle incident de la lumière est le bon, l'onde excite les plasmons de surface à l'interface du métal et du diélectrique sous forme d'onde évanescente. Cette interface est en fait un guide d'onde à pertes dont le coeur est d'épaisseur nulle [Homola, 2006a]. Le profil d'exponentielle décroissante de l'onde plasmonique de surface résulte de la présence de pertes causées par la couche métallique constituant la gaine (couches délimitant le coeur) de ce guide d'onde.

L'onde électromagnétique incidente et les plasmons de surface possèdent tous deux un vecteur d'onde et une constante de propagation  $k$  (module du vecteur d'onde). La constante de propagation de l'onde incidente ( $k_x$ ) et des plasmons de surface ( $k_{ps}$ ) sont les suivantes :

$$k_x = \frac{2\pi}{\lambda_0} n_p \sin \theta \quad (2.1)$$

$$k_{ps} = k'_{ps} + ik''_{ps} = \frac{2\pi}{\lambda_0} \sqrt{\frac{\varepsilon_d \varepsilon_m}{\varepsilon_d + \varepsilon_m}} + \frac{i\varepsilon_m''}{2(\varepsilon_m')^2} \frac{2\pi}{\lambda_0} \left(\frac{\varepsilon_d \varepsilon_m}{\varepsilon_d + \varepsilon_m}\right)^{(3/2)} \quad (2.2)$$

où  $n_p$  représente l'indice de réfraction du prisme ( $RIU$ ),  $\theta$  l'angle d'incidence de l'onde lumineuse (*degré*) et  $\lambda_0$  sa longueur d'onde ( $nm$ ).  $\varepsilon_m$  et  $\varepsilon_d$  sont respectivement la constante diélectrique, ou la permittivité, du métal et du diélectrique. La constante de propagation des plasmons de surface est un nombre complexe où la partie réelle ( $k'_{ps}$ ) est liée au vecteur de propagation et la partie imaginaire ( $k''_{ps}$ ) à l'absorption [Barnes *et al.*, 2003]. Ainsi, il faut que les parties réelles des deux constantes de propagations soient égales ( $k_x = k_{ps}$ ) afin qu'il y ait couplage entre la lumière incidente et les plasmons de surface.

$$n_p \sin \theta = \sqrt{\frac{\varepsilon_d \varepsilon_m}{\varepsilon_d + \varepsilon_m}} \quad (2.3)$$

Cette équation décrit le lien direct entre l'angle de couplage ( $\theta$ ) et l'indice de réfraction du diélectrique ( $n_d$ ), étant donné que la constante diélectrique d'un milieu est le carré de son indice de réfraction ( $\varepsilon = n^2$ ). C'est un des principes utilisés en biodétection.

## 2.2 Biodétection

L'équation 2.3 permet d'identifier l'angle de couplage optimal entre la lumière et les plasmons de surface. Expérimentalement, celui-ci est obtenu en procédant à un balayage angulaire (longueur d'onde fixe) du faisceau lumineux incident ou à un balayage en longueur

d'onde (angle d'incidence fixe) et en recueillant la lumière réfléchi à l'aide d'un détecteur. Dans le cadre de ce projet, le balayage angulaire est utilisé (figure 2.4). L'angle où l'intensité réfléchi est minimale correspond à l'angle de résonance.

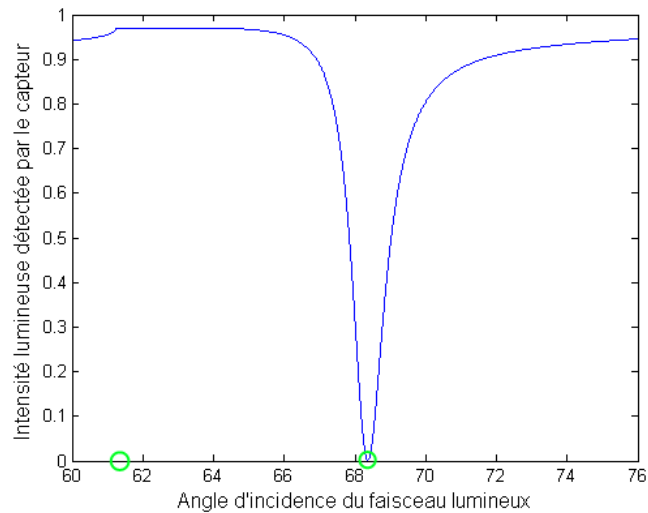


Figure 2.4 Courbe SPR typique. Le cercle de gauche représente l'angle critique de réflexion totale interne et le cercle de droite l'angle de résonance plasmonique.

Lorsque l'indice de réfraction du diélectrique varie, la valeur du vecteur d'onde change également, modifiant ainsi les conditions de résonance (figure 2.5). En SPR classique, l'intensité lumineuse recueillie par le détecteur correspond à la moyenne de l'intensité du faisceau lumineux réfléchi sur l'échantillon.

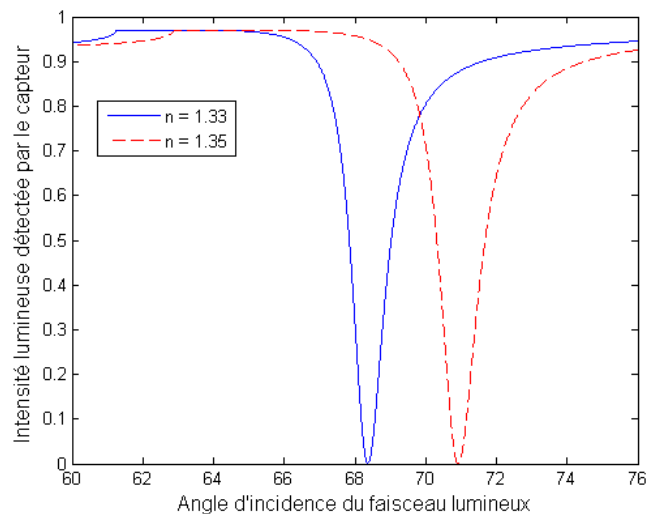


Figure 2.5 Courbe SPR représentant la variation de l'angle de résonance lorsque l'indice de réfraction du milieu ( $n$ ) change.

De plus, la courbe de réflectance résultant d'un balayage angulaire du faisceau incident peut être représentée en fonction de l'indice effectif ( $n_{eff}$ ). Celui-ci décrit comment la lumière se propage dans un guide d'onde et correspond à l'indice global du guide d'onde.

$$\beta = \frac{2\pi}{\lambda_0} n_{eff} \quad (2.4)$$

où  $\beta$  est la constante de propagation de l'onde guidée. Lorsque la lumière incidente est couplée avec le mode guidé par le guide d'onde, soit  $\beta = k_x$ , l'indice effectif résultant est :

$$n_{eff} = n_p \sin \theta \quad (2.5)$$

Cependant, l'onde de surface se propageant à l'interface de l'échantillon n'est sensible aux variations de conditions de couplage qu'à la surface de l'échantillon. La profondeur de pénétration définissant cette onde est une norme correspondant à la distance à partir de l'interface où l'amplitude de l'onde évanescente diminue à une valeur de  $1/e$ , soit de 36% son intensité initiale. Cette distance est de l'ordre de dizaines à centaines de nanomètres selon les matériaux constituant l'interface.

L'attache de molécules spécifiques sur la surface peut donc être observée en temps réel, par exemple la liaison entre la biotine et la streptavidine [Busse *et al.*, 2002]. Pour ce faire, la couche mince de métal peut être modifiée par chimie de surface en y déposant une couche biologique se liant spécifiquement à la molécule à détecter (figure 2.6).

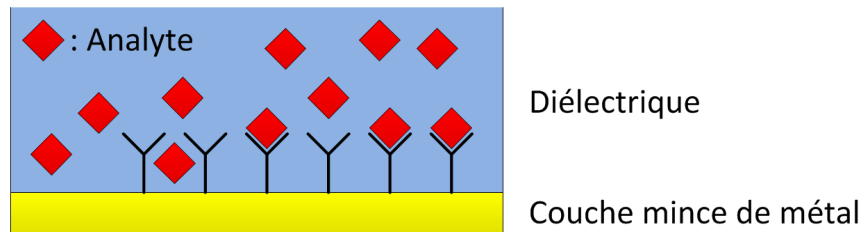


Figure 2.6 Attache moléculaire à l'interface diélectrique-métal. Ajout de structures à la surface du métal permettant de détecter spécifiquement la présence d'analytes dans le diélectrique. L'attache de ces analytes sur la surface fonctionnalisée change localement l'indice de réfraction effectif du diélectrique mesuré par le système SPR.

Une réaction chimique ou une attache moléculaire dans le diélectrique entraîne alors une modification de son indice de réfraction.

## 2.3 Microscopie SPR

La microscopie SPR est une technique permettant de localiser le couplage SPR à l'aide de lentilles et d'une caméra pixelisée (*CCD*). Ce détecteur mesure une valeur d'intensité lumineuse réfléchiée à chaque pixel, permettant de détecter la variation d'indice de réfraction point par point simultanément. À la différence de la SPR conventionnelle, le résultat sera alors une image, plutôt qu'une seule valeur. Les groupes de Yeatman [Yeatman et Ash, 1987] et de Rothenhäusler [Rothenhäusler et Knoll, 1988b] sont les premiers à avoir exploré cette méthode de caractérisation et d'analyse. Une illustration de l'utilisation de cette technique est présentée à la figure 2.7, où les conditions de couplage entre la lumière incidente et les plasmons de surface diffèrent pour les deux milieux constituant la couche diélectrique d'analyse. Le contraste dans les images correspond alors à la différence d'intensité lumineuse recueillie par le détecteur.

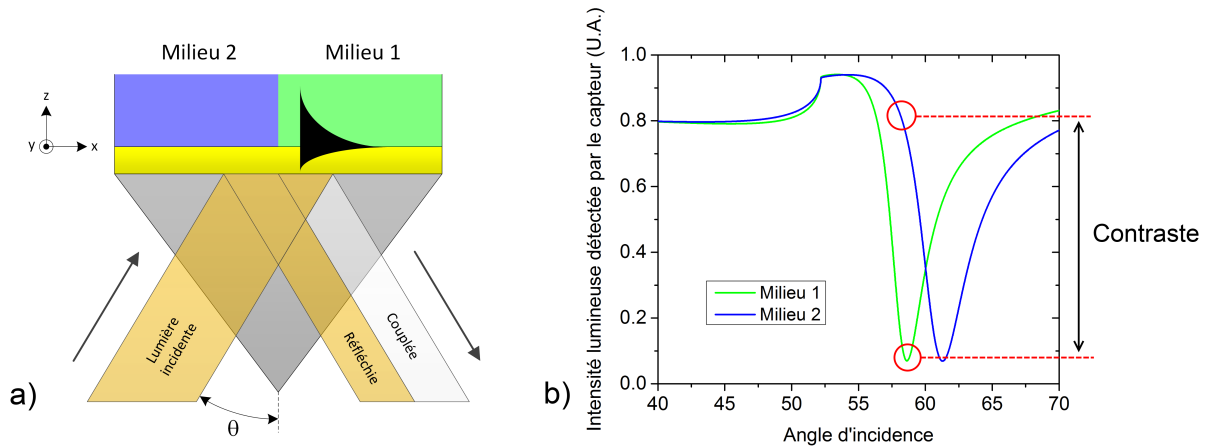


Figure 2.7 Différence de contraste en microscopie SPR. A : Lumière incidente couplée avec les plasmons de surface (milieu 1). Lumière réfléchiée à la surface (milieu 2), conditions de couplages non-adéquates. B : Contraste défini par la différence d'intensité lumineuse recueillie par le détecteur à l'angle de résonance du milieu 1 ( $\theta$ ).

Un système de microscopie est principalement caractérisé par sa résolution optique. Il existe deux types de résolution en microscopie classique, soit la résolution latérale (plan  $xy$ , échantillon) et la résolution axiale (axe  $z$ , épaisseur de l'échantillon). Le critère de Rayleigh décrit deux objets comme distincts latéralement lorsque le maximum de la tache d'Airy du premier objet coïncide avec le minimum du second. La tache d'Airy est la figure de diffraction de la lumière lorsqu'elle traverse un trou circulaire [Hecht, 1997]. Ainsi, ce critère définit la résolution latérale en microscopie classique à :

$$R = \frac{1.22f\lambda}{D} = \frac{0.61\lambda}{NA} \quad (2.6)$$

où  $R$  est le rayon d'une tache d'Airy ou la résolution latérale ( $m$ ),  $f$  la longueur focale ( $m$ ),  $\lambda$  la longueur d'onde ( $m$ ),  $D$  le diamètre de la lentille ( $m$ ) et  $NA$  son ouverture numérique. Cependant, dans le cas de la microscopie SPR, la résolution latérale est également limitée par la longueur de propagation des plasmons de surface. En effet, les plasmons de surface se propagent sur une distance définie avant d'être totalement absorbés par le métal. Cela a pour impact de propager l'information sur cette distance. La longueur de propagation des plasmons est directement liée à la partie imaginaire de la constante de propagation des plasmons de surface ( $k_{ps}''$ ) selon  $L_{ps} = (2k_{ps}'')^{-1}$  [Rothenhäusler et Knoll, 1988b]. Tel que présenté dans l'équation 2.2, elle diffère selon plusieurs variables, telles que l'absorption du métal, le milieu diélectrique et la longueur d'onde du faisceau lumineux. Par exemple, les plasmons se propagent dans l'air à la surface de l'argent sur une distance de  $22 \mu m$  et  $500 \mu m$  pour les longueurs d'onde respectives de  $514.5 nm$  et  $1060.0 nm$  [Raether, 1997].

Ainsi, la résolution parallèle à la direction de la propagation des plasmons de surface ne peut être plus petite que la longueur de propagation du plasmons (figure 2.8).

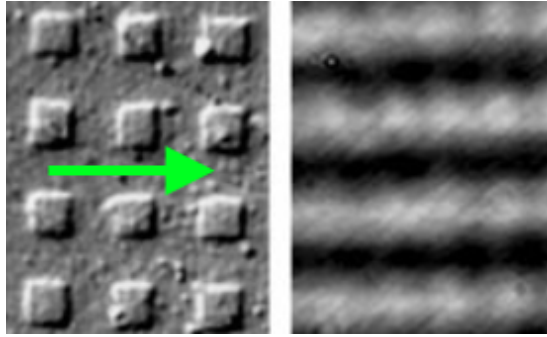


Figure 2.8 Impact de la longueur de propagation des plasmons de surface sur la résolution latérale. Figure adaptée de [Giebel *et al.*, 1999]. Les plasmons sont excités de gauche vers la droite et se propagent sur une distance supérieure à la distance entre les carrés rendant indistinguables le réseau.

Par exemple, pour le système de [Giebel *et al.*, 1999], des carrés de  $6 \mu m$  de largeur composant un réseau d'une périodicité de  $12 \mu m$  ne sont pas distinguables dans la direction de propagation des plasmons. En effet, les plasmons de surface excités à une longueur d'onde de  $633 nm$  se propagent sur une longueur de  $40 \mu m$  à l'interface d'une couche d'argent de  $53 nm$  d'épaisseur et d'air, ce qui est beaucoup plus long que la distance entre les motifs du réseau.

Ainsi, afin d'obtenir une bonne résolution latérale, il est important de bien choisir les paramètres de conception du système de microscopie SPR permettant de réduire cette longueur de propagation pour ne pas perdre d'information.

### 2.3.1 Techniques expérimentales

Il existe deux techniques pour former un microscope SPR, soit l'utilisation d'un montage avec un prisme ou avec un objectif de microscope à haute ouverture numérique [Huang *et al.*, 2007]. Cette dernière est la méthode employée au cours de ce projet, car elle permet d'observer des phénomènes à plus petite échelle. En effet, suivant l'équation 2.6, la résolution latérale est améliorée par l'emploi d'une lentille à ouverture numérique élevée.

L'objectif à haute ouverture numérique peut être utilisé dans deux configurations, l'une plaçant le plan focal lumineux incident sur le plan focal avant de l'objectif [Watanabe *et al.*, 2007], l'autre sur le plan focal arrière [Huang *et al.*, 2007]. Afin de focaliser le faisceau sur le plan focal avant, soit directement sur l'échantillon, il suffit d'envoyer un faisceau collimaté dans l'objectif de microscope (figure 2.9a). Cela permet d'exciter les plasmons de surface à un endroit précis sur l'échantillon à plusieurs angles d'incidence en même temps, en les faisant interférer entre eux.

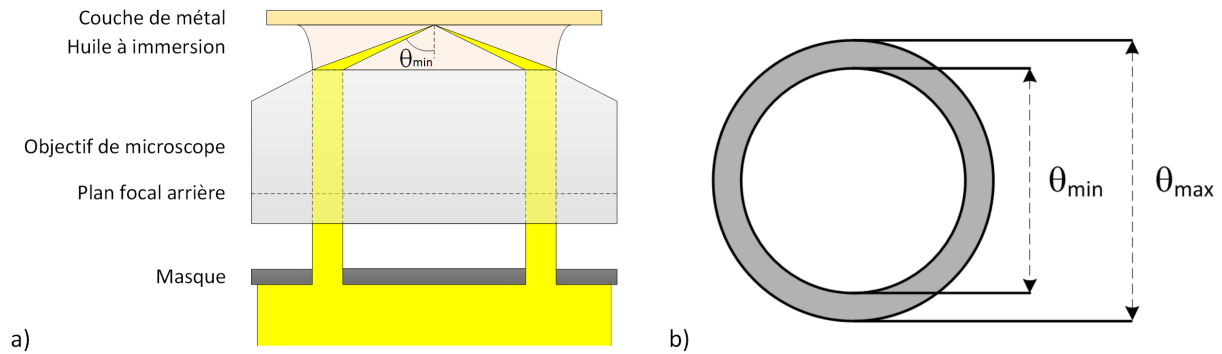


Figure 2.9 Représentation de la zone d'utilisation de l'objectif à grande ouverture numérique. Un masque est utilisé dans la figure *a* pour exciter les plasmons de surfaces qu'à des angles supérieurs à l'angle critique de réflexion totale interne. La figure *b* présente la zone utile du microscope permettant d'exciter les plasmons de surface. Celle-ci est délimitée par l'indice de réfraction du diélectrique et l'ouverture numérique de l'objectif.

La zone d'utilisation du microscope en microscopie SPR est alors un anneau (figure 2.9b) où l'angle d'incidence du faisceau est compris entre un angle près de l'angle de réflexion totale interne  $\theta_{min}$  et l'angle maximal fixé par l'ouverture numérique de l'objectif et par l'indice de réfraction de l'huile à immersion ( $\theta = \theta_{max}$ ) [Axelrod, 2001].

$$NA = n_{huile} \sin(\theta) \quad (2.7)$$

En utilisant l'équation 2.7, les angles disponibles peuvent être convertis en indice effectif. Les valeurs d'indices effectifs sont alors comprises entre l'indice de réfraction du milieu



diélectrique et l'ouverture numérique de l'objectif de microscope. Par conséquent, il faut être très attentif lors du choix des matériaux pour l'étude d'un milieu diélectrique spécifique, afin d'éviter que le couplage ne soit impossible à observer. En effet, il est possible que l'indice effectif où la résonance plasmonique survient excède la valeur de l'ouverture numérique de l'objectif de microscope. Par exemple, l'indice effectif où survient la résonance plasmonique pour une interface standard d'argent/eau ( $n_{Ag} = 0.130 + 3.195i$ ) est de 1.46. Ainsi, l'utilisation d'un objectif de microscope d'ouverture numérique inférieure à cette valeur ne permettrait pas d'observer convenablement cette résonance.

Cette méthode permet d'obtenir des images dont la résolution latérale est de l'ordre de la diffraction de la lumière [Watanabe *et al.*, 2007]. Cependant, cette technique consiste en une mesure point à point de l'échantillon nécessitant donc des déplacements mécaniques pour imager complètement l'échantillon [Somekh *et al.*, 2000]. Cette image sera d'une très bonne résolution, mais résultera en un temps d'acquisition élevé, soit en une perte de résolution temporelle.

La seconde méthode focalise le faisceau incident sur le plan focal arrière d'un objectif de microscope. À la différence de la technique précédente, le faisceau à la sortie de l'objectif est collimaté et entre en contact avec toute la surface de l'échantillon à un seul angle d'incidence. Un balayage angulaire peut être effectué en déplaçant le point de focalisation du faisceau incident sur le plan focal arrière (figure 2.10). La plage d'angles d'incidence est limitée comme pour la technique précédente.

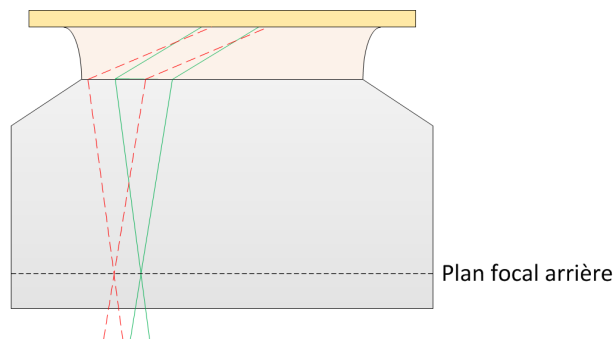


Figure 2.10 Point de focalisation du faisceau sur le plan focal arrière de l'objectif de microscope modifie l'angle d'incidence du faisceau collimaté sur l'échantillon. Balayage angulaire de l'échantillon disponible en modifiant le point de focalisation du faisceau sur l'axe.

Cette technique permet donc une excitation des plasmons de surface en champ large avec un seul angle d'incidence. Elle a permis de développer un système d'analyse SPR permettant une résolution latérale proche de la limite de diffraction de la lumière [Huang *et al.*, 2007]. Le montage utilisé dans ce projet de recherche est une adaptation de ces

travaux développée durant les travaux de thèse de *Vincent Chabot*. Il permet d'exciter au même moment le substrat avec les deux polarisations orthogonales TM et TE [Chabot, 2013]. Un cube séparateur sépare les deux polarisations du faisceau lumineux réfléchi, recueillies par deux caméras CCD (figure 2.11).

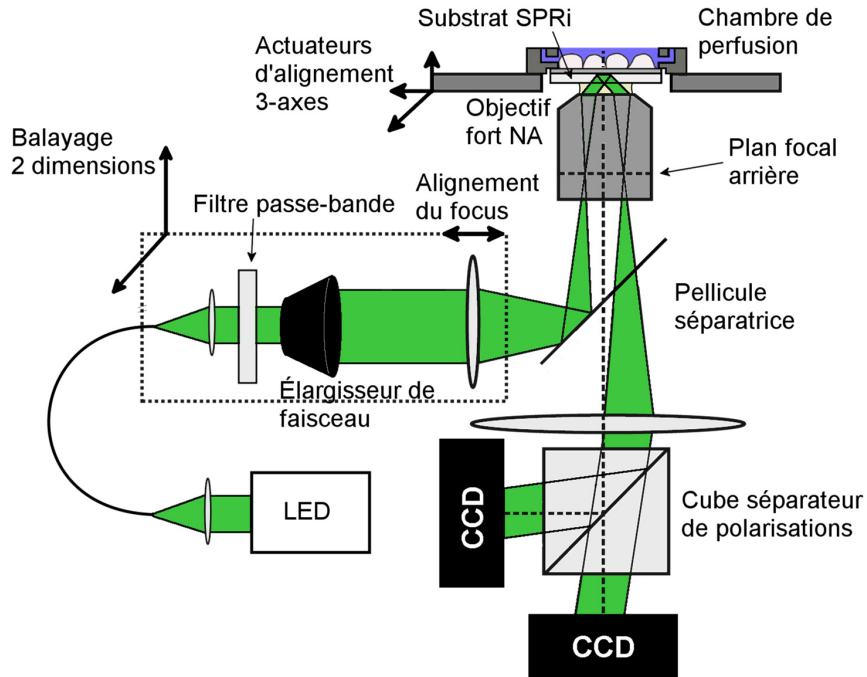


Figure 2.11 Montage pour imagerie SPR basé sur un objectif à haut ouverture numérique et un faisceau d'excitation collimaté [Chabot, 2013].

Une source DEL génère un faisceau lumineux traversant une fibre optique et un filtre passe-bande avant d'être élargi d'un facteur 10, et est focalisé par une lentille de fort diamètre sur le plan arrière d'un objectif de microscope à haute ouverture numérique (1.46). Cet élargissement du faisceau permet de faire correspondre l'ouverture numérique de l'objectif à la sortie de la fibre optique (ouverture numérique différente que celle de l'objectif de microscope). De plus, en utilisant une lentille de diamètre élevé, la taille du faisceau au point de focalisation est réduite et le faisceau est mieux collimaté à la sortie de l'objectif. Le faisceau est ensuite réfléchi par l'échantillon, puis collecté par deux caméras CCD. Également, le système d'imagerie permet de procéder à un balayage angulaire grâce à des moteurs à pas linéaires (zone pointillée dans la figure 2.11). De plus, ce montage offre la possibilité d'y ajouter une caméra de fluorescence au-dessus de l'échantillon permettant de combiner les deux techniques d'analyse, ce qui offre de l'information complémentaire sur la couche diélectrique d'intérêt. Plusieurs applications biologiques et biochimiques sont alors envisageables.

### 2.3.2 Applications

Il existe plusieurs applications de la microscopie SPR. Les deux principales catégories d'applications sont l'analyse SPR parallèle de plusieurs régions d'intérêt et l'imagerie de cellules.

L'analyse simultanée de différentes réactions biochimiques permet d'observer en temps réel leur évolution à différents endroits sur l'échantillon. Par exemple, une grille composée de micropuits permet de suivre la vitesse de liaison de biomolécules simultanément dans des régions avec différentes densité de masse d'analyte pour relier cette densité à l'indice de réfraction mesuré [Beusink *et al.*, 2008]. À la différence de la SPR conventionnelle, *Beusink et al.* ont observé cette relation directement sur une seule image. Des techniques similaires sont présentées par [Bally *et al.*, 2006] où la cinétique de liaison protéines-protéines et ADN-ADN sont suivies en temps réel. Cette technique a aussi été utilisée par [Bassil *et al.*, 2003] pour détecter la mutation de certains gènes en plaçant des versions différentes du gène sur leurs échantillons.

Par ailleurs, la microscopie SPR peut être utilisée pour analyser la cinétique de liaison entre des protéines et la membrane d'une cellule [Wang *et al.*, 2012] (figure 2.12).

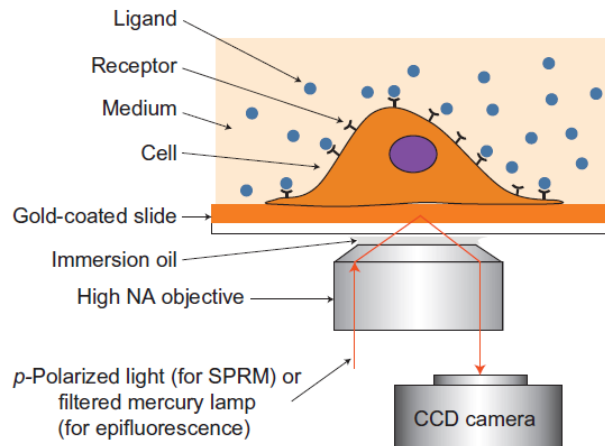


Figure 2.12 Imagerie SPR utilisant un objectif à haute ouverture numérique [Wang *et al.*, 2012]. Méthode permettant la microscopie SPR ou l'épifluorescence.

Cette technique a été jumelée dans la même étude à d'autres techniques d'analyse, soit l'épifluorescence et l'imagerie à champ clair. Ainsi, plusieurs informations différentes peuvent être obtenues simultanément. Ce type d'analyse cellulaire permet d'étudier plus efficacement l'interaction spécifique entre des drogues et des protéines à la surface de cellules.

La microscopie SPR propose donc plusieurs applications, mais peut être limitée quant aux angles d'incidences disponibles. Effectivement, tel que présenté précédemment, la résonance pour une certaine application ne peut être observée si l'angle de résonance dépasse la limite fixée par l'ouverture numérique de l'objectif de microscope. La méthode utilisée durant les travaux de thèse de *Vincent Chabot* et dans ce projet de recherche est de remplacer les échantillons SPR conventionnels (substrat/métal/diélectrique) par un guide d'onde à gaine métallique (*metal-clad waveguide*, MCWG) afin d'obtenir un pic de résonance à des valeurs d'angles inférieures [Chabot, 2013].

### 2.3.3 Guides d'ondes à gaine métallique

Un MCWG est une structure modifiée d'un guide d'onde planaire plus versatile qu'un échantillon SPR conventionnel. Elle possède une seconde couche diélectrique entre la couche mince de métal et la couche diélectrique d'intérêt (gaine), correspondant au coeur du guide d'onde. Ainsi, un échantillon SPR conventionnel est une structure particulière d'un MCWG où l'épaisseur du coeur du guide d'onde est nulle.

La réflectance totale de ce système est calculée en utilisant les équations de Fresnel pour une structure à quatre couches [Skivesen *et al.*, 2007]. Ces équations permettent de tracer la courbe de réflectance selon l'angle d'incidence du faisceau lumineux (figure 2.13).

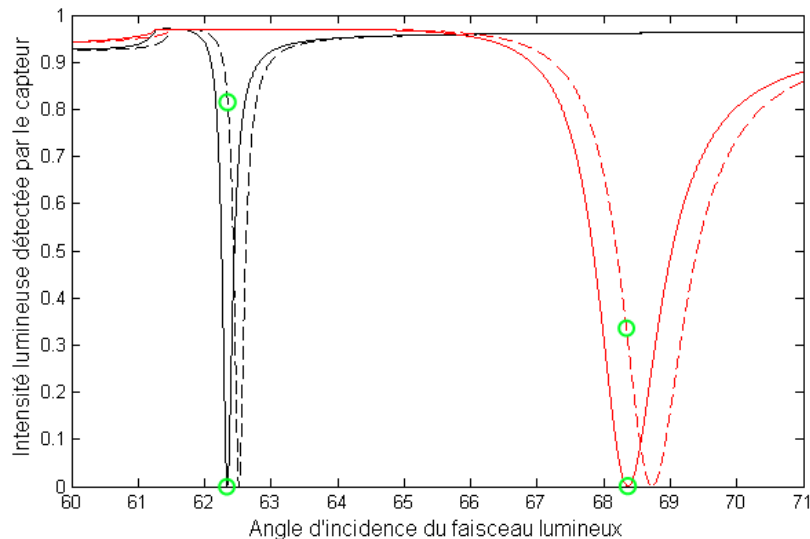


Figure 2.13 Courbes de réflectance d'un MCWG (gauche) et de SPR classique (droite). Une variation de l'indice de réfraction du milieu d'analyse de 0.003 entraîne un décalage vers la droite des courbes de réflectance. Les cercles présents sur les courbes représentent la différence d'intensité lumineuse observée par le capteur à un même angle [Skivesen *et al.*, 2007].

Cette variation de réflectance correspond alors à une variation des conditions de couplage du mode guidé TM (polarisation transverse magnétique) par le guide d'onde.

L'utilisation de MCWGs offre un meilleur contrôle sur la profondeur de pénétration dans le diélectrique et permet de choisir un angle de résonance inférieur à celui utilisé en SPR classique en variant l'épaisseur du coeur du guide d'onde. Ainsi, il est possible de diminuer la limitation occasionnée par l'ouverture numérique de l'objectif de microscope. De plus, le MCWG peut posséder plusieurs modes optiques selon l'épaisseur du coeur et la polarisation. Ainsi, en choisissant l'angle d'incidence du faisceau lumineux, celui-ci peut se coupler avec un mode précis et offrir une profondeur de pénétration supérieure à la limite de 200 nm des capteurs guides d'ondes et SPR conventionnels [Horváth *et al.*, 2002].

Plusieurs groupes de recherche ont exploité les MCWGs pour le développement de biocapteurs [Xiao *et al.*, 2012; Zourob *et al.*, 2005], en profitant de la profondeur de pénétration supérieure à celle en SPR pour atteindre une plus haute sensibilité [Zourob *et al.*, 2003]. Par exemple, un biocapteur utilisant des MCWG a été développé pour détecter en temps réel les interactions entre anticorps et antigènes [Im *et al.*, 2012]. Dans cette étude, le MCWG est utilisé de manière à détecter la variation du pic de réflectance présent à l'angle de réflexion totale interne lorsque l'indice de réfraction de la gaine est modifié par le changement de concentration de biotine marquée par l'anticorps d'intérêt. Un autre biocapteur permet d'analyser plusieurs biomolécules, tels des pesticides organophosphoriques [Zourob et Goddard, 2005]. Étant donné que le diélectrique d'intérêt se trouve dans un canal microfluidique, ce type de biocapteur peut être utilisé pour différentes applications biochimiques en modifiant le milieu d'analyse, l'analyte d'intérêt et la fonctionnalisation de la gaine.

Cependant, comme en microscopie SPR classique, les MCWGs ont une limitation en résolution latérale occasionnée par la propagation du mode guidé par le guide d'onde.

### 2.3.4 Amélioration de la résolution latérale

Il a été vu précédemment qu'une longueur de propagation des plasmons de surface supérieure à la distance entre deux structures dans une zone d'intérêt dégrade la résolution latérale dans la direction perpendiculaire au vecteur de propagation des plasmons (figure 2.8). Afin d'offrir une meilleure compréhension de la dégradation générée en microscopie SPR, [Yeatman, 1996] a développé un modèle de l'interaction des plasmons de surface. Ce modèle présente la variation de l'intensité lumineuse réfléchie lorsque les plasmons de surface traversent des transitions abruptes d'indice de réfraction (figure 2.14) :

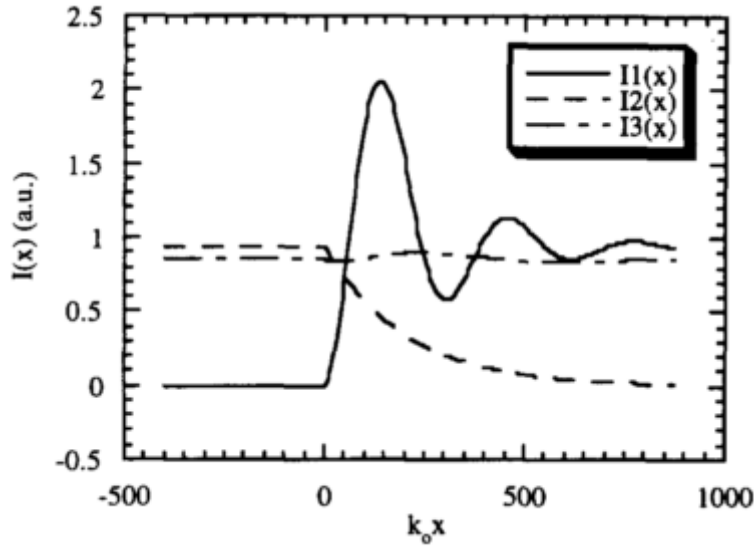


Figure 2.14 Modélisation de l'intensité lumineuse réfléchie lorsque les plasmons de surface traversent des transitions abruptes d'indice de réfraction : zone fortement couplée à faiblement couplée (I1), zone faiblement couplée à fortement couplée (I2) et aucune variation d'indice (I3) [Yeatman, 1996].

Une décroissance exponentielle de l'intensité lumineuse est observable lorsque les plasmons de surface passent d'une zone faiblement couplée à fortement couplée (I2), dont la constante à l'exposant est définie comme la « longueur » des plasmons, tandis qu'une onde sinusoïdale amortie survient lors d'une transition de l'onde plasmonique d'une zone fortement couplée à faiblement couplée (I1). La présence d'oscillations dans cette transition est causée par plusieurs phénomènes, soient la cohérence du système et la différence entre la constante de propagation des milieux formant la transition. Par ailleurs, la variation de l'intensité lumineuse lors d'une transition d'indice de réfraction est causée par l'interférence entre les plasmons de surface se propageant et ceux réfléchis à la transition, et par une dissipation de l'énergie dans le diélectrique se traduisant par une radiation.

Une étude similaire a été effectuée par [Berger *et al.*, 1994] pour décrire l'effet de la propagation des plasmons sur l'intensité réfléchie observée lors d'une variation d'indices de réfraction. Cette étude compare les profils d'intensité expérimentaux et modélisés à plusieurs longueurs d'onde. La présence d'oscillations est également observée. Par contre, il est important de noter que ces modèles ne sont pas complets. En effet, ceux-ci ne tiennent compte que des phénomènes survenant après la transition et non des réflexions des plasmons de surface causées par cette transition. De plus, ces modèles ne supportent pas des milieux diélectriques dont l'indice de réfraction est complexe, donc ne tiennent pas compte d'une absorption dans le milieu diélectrique, ce qui est le cas lorsque le milieu

d'analyse est un milieu biologique complexe. Ainsi, ces modèles ne reflètent pas exactement l'interaction entre l'onde lumineuse et les plasmons de surface lors d'une variation abrupte de conditions de couplage, mais sont plutôt des approximations du phénomène.

La dégradation en microscopie SPR est particulièrement problématique lorsque le milieu d'intérêt est formé de plusieurs structures pouvant posséder des indices de réfractions différents, comme une cellule [Giebel *et al.*, 1999] (figure 2.15).

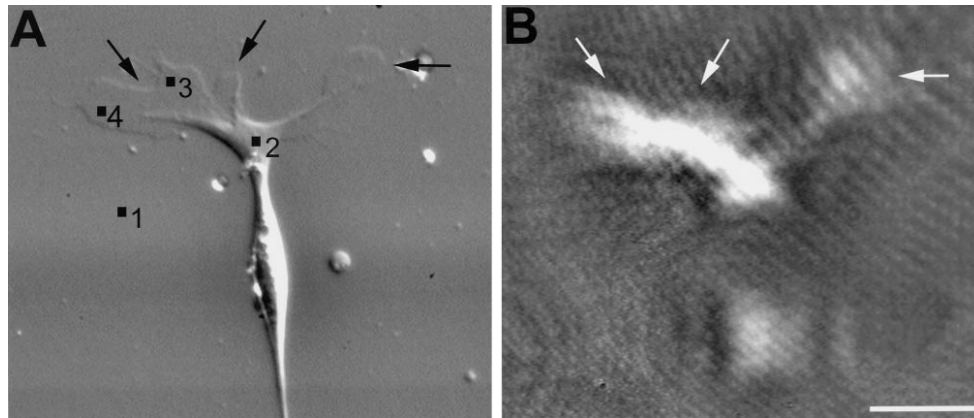


Figure 2.15 Image A obtenue par contraste de phase présentant bien les contours de la cellule. Il y a perte d'information lorsque la cellule est imagée par microscopie SPR [Giebel *et al.*, 1999]. Les zones numérotées et les points d'attache de la cellule ne sont plus aussi définis.

Il est alors difficile de prédire et de modéliser l'influence de la propagation des plasmons de surface sur l'image d'intérêt. Le manque de résolution observé dans la figure 2.15 est significatif et ne permet pas l'identification des détails de la cellule.

De nombreux groupes de recherche ont travaillé à améliorer la résolution en microscopie SPR, soient [Berger *et al.*, 1994; Berguiga *et al.*, 2007; Huang *et al.*, 2007; Kano et Knoll, 2000; Kim et Kim, 2010; Somekh *et al.*, 2000; Stabler *et al.*, 2004; Tanaka et Yamamoto, 2003; Watanabe *et al.*, 2007]. Parmi ces recherches, trois grandes approches sont distinguables. La première est basée sur l'interaction destructive entre les plasmons de surface et permet d'obtenir une résolution latérale de l'ordre du micron [Tanaka et Yamamoto, 2003]. Dans cette étude, les plasmons de surface sont excités simultanément dans plusieurs orientations à l'angle de résonance plasmonique et vont interférer entre eux. Quatre photodétecteurs recueillent l'intensité réfléchie par l'échantillon et un balayage de celui-ci est effectué pour obtenir quatre images.

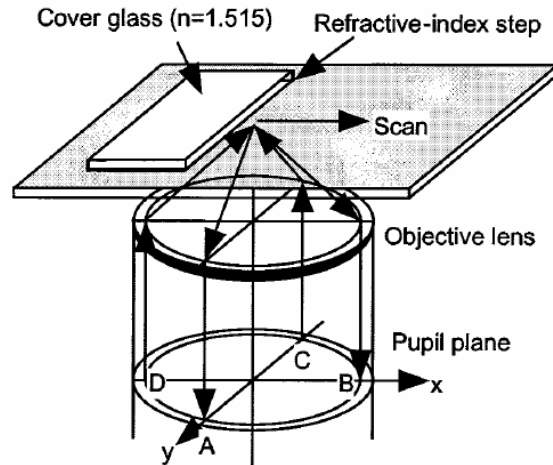


Figure 2.16 Représentation de l'interférence des plasmons de surface à l'interface de l'échantillon lorsque le point de focalisation varie [Somekh *et al.*, 2000].

Les images obtenues offrent une résolution différente selon la direction de propagation des plasmons de surface. Effectivement, une résolution de  $6 \mu m$  est observée lorsque l'onde plasmonique se propage perpendiculairement aux transitions d'indice de réfraction, tandis qu'elle est de  $1.6 \mu m$  lorsque la propagation est parallèle aux transitions. Cette différence de résolution d'un facteur d'environ 4 signifie que leur technique n'est pas optimale, mais que l'orientation de la propagation peut être exploitée pour obtenir des images de meilleure résolution, tel que proposé par [Tanaka et Yamamoto, 2003]. L'interférence des plasmons de surface offre une bonne résolution latérale, mais elle dépend de la résolution temporelle, car un balayage est nécessaire pour obtenir une image de l'échantillon. Cependant, cette technique ne permet pas de balayage angulaire rendant l'étude de spécimens biologiques difficile [Chabot *et al.*, 2012]. Ainsi, une méthode permettant de rester en conditions de couplage maximal aux plasmons de surface offrirait de meilleurs contrastes.

La seconde approche est basée sur l'augmentation de l'absorption en utilisant un métal absorbant comme le cuivre [Huang *et al.*, 2007] ou en changeant de longueur d'onde incidente [Berger *et al.*, 1994]. Une absorption plus importante réduit la longueur de propagation des plasmons de surface, améliorant ainsi la résolution latérale, mais au dépend d'un moins bon contraste dans les images. Par ailleurs, cette amélioration de la résolution est observée lorsque la longueur d'onde incidente diminue. Par exemple, pour une interface or/air, la longueur de propagation des plasmons de surface est de  $14 \mu m$  et  $0.5 \mu m$  pour des longueurs d'onde respectives de  $676.4 nm$  et  $530.9 nm$  [Berger *et al.*, 1994].

La dernière approche exploite la nanostructuration de la couche métallique pour créer des plasmons localisés limitant ainsi la propagation de l'onde de surface. Ce groupe a étudié l'argent et l'or comme couche de métal, tout en variant l'épaisseur et l'orientation des



différentes structures de réseaux métalliques utilisés. Cette approche n'a pas été retenue pour ce projet de recherche, car elle nécessite la nanostructuration des échantillons qui requiert des étapes de fabrication complexes.

Les techniques étudiées dans ce projet de maîtrise vont plutôt se tourner vers le traitement des images acquises que vers des modifications matérielles (techniques d'acquisition ou fabrication d'échantillons). Celles-ci vont permettre de rester dans les meilleures conditions de couplage tout en conservant une bonne résolution en indice de réfraction, et de compenser la dégradation de l'image due à la propagation des plasmons de surface par la combinaison des images acquises.

## 2.4 Post-traitement des images

La déconvolution est une technique intéressante offrant plusieurs opportunités face au problème de résolution en microscopie SPR. En effet, les images obtenues en microscopie SPR, telles que présentées aux figures 2.8 et 2.15, correspondent à une convolution entre une image nette et une fonction d'étalement du point (*point spread function*, PSF), soit la dégradation due à la propagation des plasmons de surface. Une PSF est la réponse impulsionnelle d'un système. La déconvolution est un procédé mathématique permettant d'appliquer le traitement inverse de la PSF, par exemple de s'affranchir d'un flou dans une image dégradée. Par ailleurs, la dégradation observée en microscopie SPR est directionnelle, et peut être considérée analogue à un flou directionnel. Cette dégradation correspond donc à la PSF. Ainsi, l'opération de déconvolution pourrait être appliquée sur les images de microscopie SPR pour y retirer cette dégradation.

Il existe également d'autres techniques pour retirer un flou directionnel d'une série d'images d'un même objet, comme la super-résolution. Celle-ci consiste à générer une image de haute résolution à partir d'images de basse résolution où l'information des pixels est différente et décalée [Park *et al.*, 2003]. Cependant, cette méthode n'est pas applicable au problème étudié ici, étant donné que l'appareil d'acquisition est fixe, et que le flou directionnel n'est pas associé à un mouvement physique de l'objet imagé, mais plutôt un phénomène optique.

L'opération de déconvolution a été appliquée sur des images ayant été dégradées par un flou directionnel différent [Harikumar et Bresler, 1999; Rav-Acha et Peleg, 2005; Yaroslavsky et Caulfield, 1994]. L'approche employée par [Rav-Acha et Peleg, 2005] démontre qu'en utilisant deux images d'un même objet transformé par un flou directionnel différent, la qualité du résultat d'une opération de restauration d'image peut être augmentée. Deux algorithmes ont été développés dans cette étude. Le premier détermine la PSF à partir

des images acquises, sans avoir besoin d'information préalablement, et le second retire la dégradation des images en utilisant la PSF calculée. Ces deux algorithmes procèdent à des minimisations non-linéaires réduisant l'erreur au carré. Les équations mathématiques de ces algorithmes sont présentées dans l'article publié au chapitre 4. La figure 2.17 présente une image restaurée (d) utilisant l'information des deux images avec un flou directionnel différent (a et b) et le résultat de la minimisation non-linéaire n'utilisant qu'une seule image (c) [Rav-Acha et Peleg, 2005].

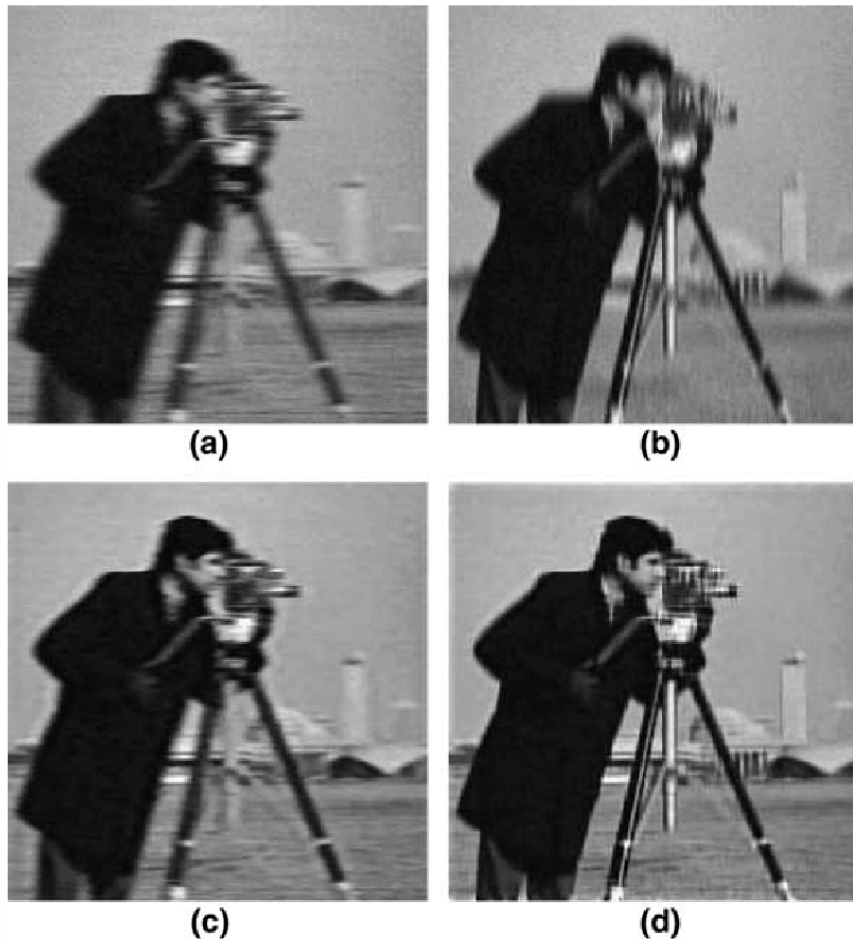


Figure 2.17 A et B : Images d'un caméraman transformées par un flou de mouvement de directions différentes. C et D : Déconvolution avec respectivement une et deux images. Figure issue de [Rav-Acha et Peleg, 2005].

Donc, en utilisant plusieurs images de microscopie SPR où la direction de la propagation est différente, l'algorithme développé par [Rav-Acha et Peleg, 2005] pourrait être implémenté pour retirer la dégradation. L'utilisation d'un algorithme de reconstruction d'images pour améliorer des images de microscopie SPR ou MCWG n'a jamais été exploitée. C'est l'approche préférée par ce projet de recherche.

## Conclusion

Dans ce chapitre, il a été question de l'état de l'art des techniques liées à ce projet de maîtrise. La théorie portant sur la technique d'analyse de la SPR a été abordée, ainsi que ses applications dans le domaine biomédical et biologique, afin de bien comprendre la technique de microscopie exploitant la SPR. Les différents avantages et limitations de cette dernière ont alors été identifiés, ainsi que les approches existantes pour résoudre le problème de résolution latérale. Finalement, une nouvelle approche permettant l'amélioration de la résolution latérale en microscopie SPR a été identifiée en s'intéressant aux algorithmes de correction de flous de mouvement sur des images, et choisie pour l'étude de ce mémoire.



# CHAPITRE 3

## ESTIMATION DES PARAMÈTRES ET FABRICATION DE SUBSTRATS

Ce chapitre présente l'estimation des paramètres nécessaires à l'exécution de la procédure de restauration d'images. Ceux-ci consistent en la constante de propagation de l'échantillon et la fréquence d'oscillation des franges d'interférences présentes dans l'image. Ensuite, une méthode permettant de calculer à partir des images acquises les indices de réfraction constituant la couche diélectrique d'analyse est décrites. Finalement, les étapes de fabrication des substrats sont présentées.

### 3.1 Identification des paramètres

Les paramètres nécessaires à l'exécution de l'algorithme de restauration d'images sont estimés directement à partir des images acquises. La constante de propagation de l'onde de surface est nécessaire pour obtenir la PSF, soit la dégradation causée par la propagation de l'onde, tandis que la fréquence d'oscillation est utilisée pour retirer la non-linéarité du système par un filtrage.

Tel que présenté à la section 2.1, la constante de propagation de l'onde plasmonique de surface est calculée à partir des constantes diélectriques de l'interface (équation 2.2 pour les échantillons SPR classiques). Cela implique que la constante de propagation ne peut être calculée précisément lorsque le diélectrique est inconnu, ce qui est le cas pour des cellules biologiques. De plus, pour les échantillons MCWG utilisés dans ce projet, le coeur du guide d'onde n'est plus négligeable. Ainsi, l'équation 2.2 ne peut être utilisée pour calculer la constante de propagation d'un échantillon MCWG. L'équation des valeurs propres pour les modes TM proposée dans [Homola, 2006b] permet de calculer une constante de propagation inconnue ( $\beta$ ) pour un guide d'onde à trois couches (métal/coeur/diélectrique pour un MCWG).

$$\tan(\kappa d) = \frac{\gamma_1 \varepsilon_2 / \kappa \varepsilon_1 + \gamma_3 \varepsilon_2 / \kappa \varepsilon_3}{1 - (\gamma_1 \varepsilon_2 / \kappa \varepsilon_1)(\gamma_3 \varepsilon_2 / \kappa \varepsilon_3)} \quad (3.1)$$

où  $\kappa^2 = \omega^2 \varepsilon_2 \varepsilon_0 \mu_0 - \beta^2$  et  $\gamma_{1,3}^2 = \beta^2 - \omega^2 \varepsilon_{1,3} \varepsilon_0 \mu_0$ .  $\kappa$  et  $\gamma_{1,3}$  sont respectivement les vecteurs d'onde du coeur (2) et des gaines (1 : métal, 3 : diélectrique), tandis que  $\varepsilon_0$  et  $\mu_0$  correspondent à la permittivité et à la perméabilité du vide. Dans cette équation, la constante

de propagation n'est pas facilement isolable et ne peut donc pas être calculée directement comme pour la SPR avec l'équation 2.2. Ainsi, un algorithme de minimisation par les moindres carrés a été développé sous Matlab afin de calculer la constante de propagation complexe du mode TM pour un échantillon MCWG à partir de l'équation 3.1. Celui-ci calcule le résidu ( $R$ ) au carré pour une intervalle de valeurs complexes  $\beta$ .

$$R^2 = \left[ \tan(\kappa d) - \frac{\gamma_1 \varepsilon_2 / \kappa \varepsilon_1 + \gamma_3 \varepsilon_2 / \kappa \varepsilon_3}{1 - (\gamma_1 \varepsilon_2 / \kappa \varepsilon_1)(\gamma_3 \varepsilon_2 / \kappa \varepsilon_3)} \right]^2 \quad (3.2)$$

La valeur minimale obtenue par l'algorithme correspond au résultat du résidu au carré de la constante de propagation.

La fréquence d'oscillation présente lors d'une transition de l'onde de surface d'une zone fortement à faiblement couplée est déterminée de deux façons. La première est en observant une coupe de l'image acquise dans la direction de propagation de l'onde. La fréquence d'oscillation est alors calculée grâce au spectre de fréquences de Fourier ou directement à partir de la coupe en observant la quantité de pixels formant une période d'oscillation. La seconde méthode détermine la fréquence d'oscillation à partir des constantes de propagation du milieu fortement couplé et celle du milieu faiblement couplé [Berger *et al.*, 1994; Yeatman, 1996]. La fréquence correspond à la différence entre la partie réelle des deux constantes de propagation ( $k_x$ ).

$$f_{osc} = k_{xA} - k_{xB} \quad (3.3)$$

où  $A$  et  $B$  sont respectivement les milieux fortement et faiblement couplés, et où l'onde de surface se propage du milieu  $A$  à  $B$ . Cependant, cette dernière méthode n'est pas directement utilisable si l'indice de réfraction d'un des milieux est inconnu, car la constante de propagation ne peut pas être calculée sans tous les indices de réfraction.

## 3.2 Estimation des indices de réfraction inconnus

La fréquence d'oscillation observée sur une image acquise est utilisée pour déterminer la constante de propagation du milieu en faible résonance dont l'indice de réfraction est inconnu en utilisant l'équation 3.3. Il suffit d'utiliser la constante de propagation calculée pour déterminer la valeur de l'indice de réfraction inconnu en utilisant l'équation 3.1. Un algorithme a été développé permettant de calculer des fréquences d'oscillations pour différentes variations d'indice de réfraction et de les comparer avec la fréquence d'oscillation des franges d'interférence observées sur l'image acquise. Cet algorithme calcule la fréquence d'oscillations pour des empilements de couches différents (seul l'indice de réfraction du

milieu diélectrique inconnu est variable), puis les compare avec la fréquence moyenne des oscillations dans la zone de l'image sélectionnée. Une précision d'indice de réfraction du diélectrique de  $\pm 2.5 \cdot 10^{-3}$  permet l'identification exacte de cet indice.

La figure 3.1 présente une image acquise permettant de calculer l'indice de réfraction du milieu en faible résonance, l'air étant le milieu fortement couplé.

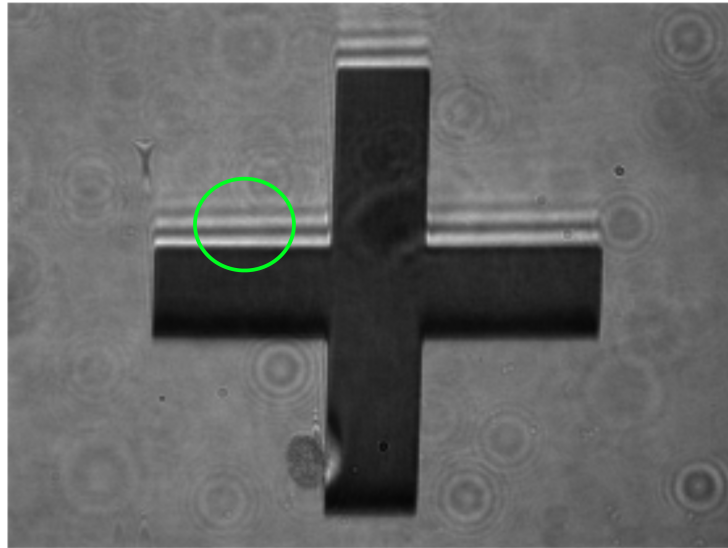


Figure 3.1 Calcul de l'indice de réfraction d'un milieu inconnu à partir des franges d'interférence (zone encadrée verte) présentes dans l'image acquise. Zone fortement couplée : Air ( $n_{air} = 1$ ). Zone faiblement couplée : PDMS ( $n_{PDMS} = 1.4$ ).

La valeur calculée pour cet exemple est de  $1.4 \pm 2.5 \cdot 10^{-3}$  pour le PDMS et valide ce processus d'identification. Ainsi, la valeur d'indice de réfraction d'un milieu inconnu peut être déterminée à partir de seulement l'information présente dans une image acquise et des paramètres physiques connus.

### 3.3 Fabrication des échantillons

Tel que présenté à la section 2.3.3, le couplage SPR ne peut être complètement observé avec l'objectif de microscope du système d'imagerie SPR/MCWG (figure 2.11), car l'indice effectif où la résonance survient excède l'ouverture numérique de l'objectif. Ainsi, les substrats utilisés dans ce projet sont des guides d'ondes à gaine métallique (MCWG). Le coeur du guide d'onde est composé de la photo-résine KMPR, comparable à la SU-8 par son indice de réfraction, mais offrant un temps de procédé de fabrication inférieur [Convert *et al.*, 2012], et moins coûteux qu'une couche d'oxyde. Deux validations du processus de

restauration d'images ont été effectuées dans ce projet de recherche, soit sur des structures synthétiques et des cellules biologiques. Seule la couche diélectrique analysée diffère. Les structures synthétiques sont composées d'air emprisonné par du PDMS, tandis que les cellules biologiques sont fixées à la surface des échantillons et se trouvent dans l'air (figure 3.2). Le contraste dans les images acquises correspond alors à une différence de condition de couplage entre l'air et le PDMS pour les structures synthétiques, et entre l'air et les cellules biologiques. Le couplage survient avec l'air pour les deux types d'échantillons. Par ailleurs, le PDMS a été choisi car il est facile à fabriquer et structurer par estampillage, offrant ainsi des échantillons reproductibles avec des structures de dimensions connues, et que son indice de réfraction ( $n_{PDMS} = 1.4$ ) est proche de celui des cellules biologiques ( $n \approx 1.35 - 1.40$ ).

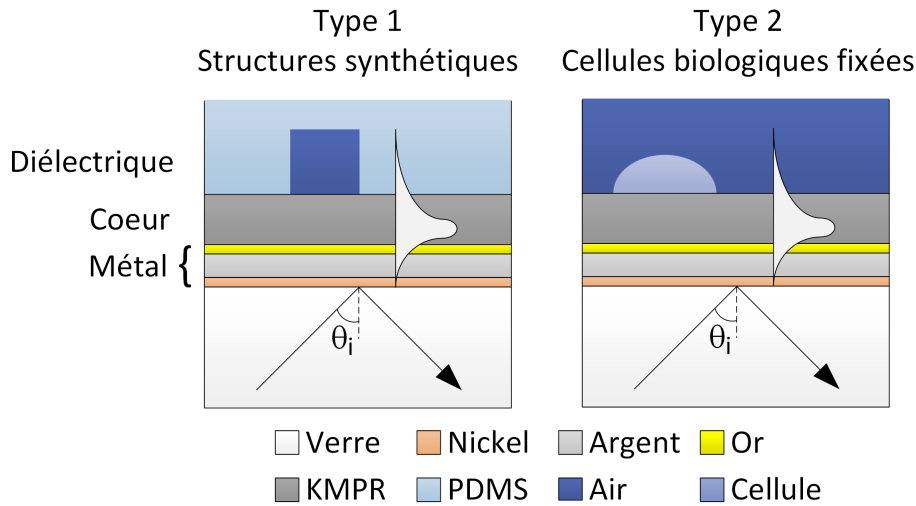


Figure 3.2 Échantillons fabriqués où seulement la couche de diélectrique est différente. Type 1 : structures synthétiques (air et PDMS). Type 2 : Cellules biologiques fixées (cellules et air).

Des lamelles de verre Gold Seal ( $48 \times 65 \text{ mm}$ , No 1, Thomas Scientific, USA) et Fisherfinest Premium ( $24 \times 40 \text{ mm}$ , Fisher Scientific, USA) ont servi de substrats. Celles-ci ont tout d'abord été nettoyées aux solvants (acétone, isopropanol et eau déionisée) avec agitation d'ultrasons de 5 minutes afin d'éliminer toute trace de contaminants, et séchées par azote. Trois couches de métal ont ensuite été déposées par évaporateur à faisceau d'électron (Int'l-Vac, USA) sans briser le vide entre les évaporations pour éviter l'oxydation des métaux. Ces couches sont  $3 \text{ nm}$  de nickel (couche d'adhésion),  $30 \text{ nm}$  d'argent (couche active) et  $5 \text{ nm}$  d'or (couche de passivation de l'argent et de bio-compatibilité) [Chabot *et al.*, 2012]. L'épaisseur de ces couches a été mesurée par une microbalance à quartz Maxtek SC-101 (Inficon, USA) pendant le dépôt. Les lamelles de verre métallisées ont été nettoyées



de nouveau aux solvants avec agitation d'ultrasons de 5 minutes, séchées par azote, puis déshydratées dans un four (30 *min*, 125 °C). Après déshydratation, une solution de 25% KMPR 1005/SU-8 2000 Thinner a été étalée (dépôt statique : 3 *sec* à 500 *RPM*, 60 *sec* à 3600 *RPM*, 5 *sec* à 0 *RPM*) sur la couche d'or par une étaleuse Polos 150 (SPS-Europe, Netherlands) pour obtenir une couche de 360 *nm* [Convert *et al.*, 2012] agissant comme coeur du MCWG. La couche de KMPR a été cuite sur une plaque chauffante (1 *min*, 100 °C), exposée sans masque (8 *sec*, 15 *mW/cm*<sup>2</sup>) sur une aligneuse 200 Mask Aligner (OAI, USA), recuite sur plaque chauffante (1 *min*, 100 °C) et cuite au four (3 *h*, 180 °C) pour la solidifier.

Afin de fabriquer les structures synthétiques de PDMS, un masque maître pour estampillage de PDMS a été créé en utilisant une gaufre de silicium 3P1-10 de 3 pouces (WRS Materials, USA). La gaufre a été nettoyée aux solvants (acétone, isopropanol et eau déionisée) avec agitation d'ultrasons de 5 minutes, séchée par azote et déshydratée dans un four (30 *min*, 125 °C). Du MCC Primer 80/20 (Microchem Corp, USA) a tout d'abord été étalé pour agir comme couche d'adhésion (dépôt dynamique de quelques gouttes : 5 *sec* à 500 *RPM*/60 *sec* à 5000 *RPM*/5 *sec* à 0 *RPM*), puis de la photo résine Microposit S1813 (Shibley Company, USA) a été étalée (dépôt statique : 5 *sec* à 500 *RPM*, 30 *sec* à 5000 *RPM*, 7 *sec* à 0 *RPM*) et cuite sur plaque chauffante (1 *min*, 115 °C) afin d'obtenir une couche de 1.3  $\mu\text{m}$  d'épaisseur. La gaufre a ensuite été exposée (8 *sec*, 15 *mW/cm*<sup>2</sup>) avec un masque structuré sur une aligneuse 806MBA (OAI, USA), développée (30 *sec*) dans un béccher de Microposit MF-319 (Shibley Compagny, USA), rincée à l'eau déionisée et finalement séchée par azote. Les structures du masque maître sont alors composées de photo-résine S1813 sur Si. Le PDMS a été préparé en mélangeant 1 :10 (agent de durcissement pour base, Sigma-Aldrich, Canada). Le mélange a été dégazé dans un dessiccateur à vide, puis coulé sur la gaufre de silicium structurée et recuit dans un four (1 *h*, 100 °C). Le PDMS a par la suite été décollé, coupé, exposé à lumière UV (2 *sec*, 15 *mW/cm*<sup>2</sup>) [Nilsson, 2005] et fixé directement sur la couche de KMPR. L'étape d'exposition a permis de coller le PDMS sur la photo-résine KMPR, plutôt qu'un procédé standard d'exposition au plasma  $O_2$  pour un collage PDMS/verre ou PDMS/PDMS. Cependant, ce collage ne résiste pas à un décollage manuel. Ainsi, en collant le PDMS sur l'échantillon, les structures étaient composées d'air emprisonné, proposant alors une variation d'indices de réfraction dans la couche de diélectrique entre l'air ( $n_{air} = 1$ ) et le PDMS ( $n_{PDMS} = 1.4$ ).

Pour ce qui est des échantillons cellulaires, les gliomes de lignée cellulaire U251 (Japan Health Sciences Foundation, Japon) ont été maintenus dans des flacons de culture sans revêtement (75 *cm*<sup>2</sup>, Flacon, USA) en utilisant du « Dulbecco's Modified Eagles Medium »

(DMEM) supplémenté par 20% de sérum de veau fœtal (FBS) inactivé à la température pour une culture plus rapide [JCBR Cell Bank, 2014], des acides aminés non essentiels, 60  $U/mL$  de pénicilline, 60  $mg/mL$  de streptomycine et 2  $nM$  de L-Glutamine. La fixation des cellules a été effectuée en les parsemant sur le substrat MCWG et en les cultivant dans un incubateur humide à 37 °C contenant 5 % de  $CO_2$  dans l'air. Une confluence de 30 % a été obtenue après 72 heures de culture. Afin de les imager dans l'air, les cellules ont été nettoyées à deux reprises dans du tampon phosphate salin chaud (PBS), fixées avec une solution de 4 % de paraformaldéhyde (PFA) et asséchées par une série de solutions d'éthanol/eau déionisée (20 à 100 % d'éthanol, pas de 20 %).

Ainsi, ces échantillons ont permis l'observation et l'acquisition de variations de contraste dans leur couche diélectrique.

## Conclusion

Dans ce chapitre, l'estimation des paramètres utilisés par l'algorithme de restauration d'images a été décrite. La constante de propagation d'un guide d'onde à trois couches est calculée par un algorithme développé sous Matlab, et la fréquence d'oscillation associée aux franges d'interférence dans les images acquises est déterminée à partir d'un modèle physique. Une méthode pour identifier les valeurs d'indice de réfraction composant la couche diélectrique sondée a également été présentée. Finalement, les étapes de fabrication des substrats et de la couche diélectrique ont été décrites. Le chapitre 4 suivant présente la procédure de restauration d'images à partir des images acquises pour y améliorer la résolution latérale en retirant la dégradation causée par la propagation de l'onde de surface. Les étapes de fabrication des échantillons présentées dans le chapitre 3 ne figurent pas dans cet article, mais sont nécessaires à la compréhension du projet.

# CHAPITRE 4

## ALGORITHME DE RESTAURATION DÉVELOPPÉ ET RÉSULTATS SUR ÉCHANTILLONS SYNTHÉTIQUES

### Avant-propos

#### **Auteurs et affiliations :**

Frédéric A. Banville : Étudiant à la maîtrise, Université de Sherbrooke, Faculté de génie, Département de génie électrique et de génie informatique.

Thomas Söllradl : Étudiant au doctorat, Université de Sherbrooke, Faculté de génie, Département de génie électrique et de génie informatique.

Pierre-Jean Zermatten : Étudiant au post-doctorat, Université de Sherbrooke, Faculté de génie, Département de génie électrique et de génie informatique.

Michel Grandbois : Professeur, Université de Sherbrooke, Faculté de médecine, Département de pharmacologie.

Paul G. Charette : Professeur, Université de Sherbrooke, Faculté de génie, Département de génie électrique et de génie informatique.

**Date d'acceptation :** 5 Novembre 2014

**État de l'acceptation :** version finale publiée

**Revue :** Optics Letters

**Référence :** F.A. Banville, T. Söllradl, P.-J. Zermatten, M. Grandbois and P.G. Charette. (2014) "Improved resolution in SPR and MCWG microscopy by combining images acquired with distinct mode propagation directions", Optics Letters.

**Titre français :** Amélioration de la résolution en microscopie SPR et MCWG par combinaison d'images acquises avec directions de propagation de mode distinctes.

**Contribution au document :** Cet article expose et valide sur structures synthétiques la procédure de restauration d'images développée lors de ce projet. Une analyse de la physique et des mathématiques du modèle de [Berger *et al.*, 1994] est présentée et adaptée pour être appliquée au projet. Des images de structures synthétiques sont acquises et restaurées par l'algorithme de restauration d'images implémenté. Cette publication montre donc l'amélioration de la résolution latérale en imagerie SPR et MCWG en utilisant la procédure développée dans cette thèse.

**Résumé français :** En imagerie de résonance de plasmons de surface (SPR) de haute-résolution, la résolution latérale est limitée par la longueur de propagation des plasmons. Bien que les systèmes de microscopie SPR peuvent atteindre une résolution inférieure au micromètre, la longueur de propagation provoque une dégradation de l'image dans la direction de propagation des plasmons s'apparentant à un artefact de flou, accompagnée d'oscillations le long de transitions de zones résonantes à non-résonantes. Nous présentons une méthode pour réduire significativement cet effet, se basant sur la combinaison d'images d'un même échantillon acquises avec des directions distinctes de propagation du mode guidé. La SPR étant un cas particulier de la classe de structures optiques nommées guides d'ondes à gaine métallique (MCWG) qui sont également affectées par la longueur de propagation, ce travail est largement applicable.

## 4.1 Article

Surface plasmons (SPs) are coherent electron oscillations at a metal-dielectric interface. In order to excite SPs with light, the incoming light wave vector must match that of SPs. Under optimal coupling conditions, the energy of the incident light is coupled to the SPs, and no light is reflected back from the interface – this is known as surface plasmon resonance (SPR). Coupling conditions are highly dependent on the refractive index of the dielectric in close proximity to the interface, this is, within the distance for which the magnitude of the evanescent field associated with the SPs is significant. By measuring the amplitude of light reflected from the interface, changes in reflectivity can be correlated with changes in the dielectric refractive index in close proximity to the surface – this is the basis for the well-known SPR biosensing technique [Homola, 2008].

When reflectivity is measured with a 2D array such as a CCD camera, the refractive index distribution in the plane of the metal-dielectric interface can be resolved – this is known as SPR microscopy or SPR imaging (SPRi) [Rothenhäusler et Knoll, 1988b]. In most SPR systems, light is coupled to the SPs via a prism [Kretschmann, 1972]. Due to size of the prism, SPRi systems must use long working distance optics for collecting the reflected light, thereby limiting the imaging resolution to well above  $1 \mu\text{m}$ .

Alternatively, by using a high-numerical aperture objective to couple light to the SPs and collect the reflected light, sub-micrometer imaging can be achieved [Huang *et al.*, 2007]. In this case, however, lateral resolution is limited along the direction of plasmon propagation by the finite "plasmon propagation length" also known as the "longitudinal decay length," defined as the distance over which the evanescent field power decays to  $1/e$  of its initial value in the direction of propagation [Barnes, 2006; Berger *et al.*, 1994]. The propagation length of SPs excited at visible and near-IR wavelengths at the interface between Au or Ag thin films and commonly-used dielectrics is several  $\mu\text{m}$  in length. As a result, in a SPRi system capable of sub-micrometer resolution, plasmon propagation causes a degradation in the images akin to a 1D blurring artifact along the axis of propagation.

To date, three main approaches have been proposed to alleviate this effect. The first involves using lossy metals such as Cu or adding an absorbing layer [Huang *et al.*, 2007]. The additional losses effectively detune the system, however, resulting in a decrease in refractive index measurement sensitivity. The second method takes advantage of plasmon self-interference [Kano et Knoll, 2000; Somekh *et al.*, 2000]. This method requires point-by-point scanning to build up a complete image, resulting in a significant loss of temporal

resolution. Finally, surface nanostructuring can be used to limit the plasmon propagation length [Kim et Kim, 2010].

Note that this effect (image degradation due to longitudinal decay length) is not unique to SPR. From an electromagnetics point of view, SPR simply involves evanescent coupling to a waveguide. Indeed, SPR is part of the broader class of optical structures known as "metal-clad waveguides" (MCWG) [Skivesen *et al.*, 2005]. SPR is a special case in that the waveguide core is the electron cloud at the metal/dielectric interface rather than a physical layer, and the core thickness is effectively zero in Maxwell's equations solved at the interface [Yeh, 1988]. As with dielectric waveguides, MCWG can support multiple guided modes given a sufficiently thick core, where the plasmon mode is the lowest order mode (highest effective index), and the higher order modes do not involve plasmons though they are similarly lossy due to the metal cladding.

As with SPR, when MCWG are used as sensors, coupling conditions are tuned such that the intrinsic losses in the waveguide and the re-radiative losses to the input optical system are matched, resulting in complete "absorption" of the input excitation light. As such, the concept of "longitudinal decay length" also applies to MCWG substrates. One of the advantages of coupling to a higher order nonplasmon modes in MCWG for high-resolution imaging is that the numerical aperture of the coupling objective can be reduced. The experimental results presented below were obtained with MCWG substrates.

In this Letter, we demonstrate a method for improving spatial resolution in sub-micrometer MCWG/SPR imaging based on processing multiple reflectivity images of a sample, each acquired with a distinct mode propagation direction. Deconvolution and optimization methods are used to calculate an optimal reflectivity image with improved resolution. The number of images required is small, so that the impact on temporal resolution is negligible at timescales typical of most experiments.

Our work was inspired by research in image processing on eliminating blur artifacts due to camera shake. In the algorithm [Rav-Acha et Peleg, 2005] that underpins our proposed method, a set of  $N$  images of a static scene taken with a single camera, each having distinct magnitude and direction of camera shake, is used in an optimization procedure to generate an estimate of the "de-blurred" image. Starting from an initial estimate (average of the input images), the optimal estimate,  $\hat{f}$ , is calculated iteratively from the input blurred images,  $g_i$ , ( $i = 1 \times \dots N$ ), using the method of steepest descent :

$$\hat{f} \leftarrow \hat{f} + \alpha \sum_{i=1}^N h_i^T * (g_i - \hat{f} * h_i), \quad (4.1)$$

where  $h_i$  are the impulse responses corresponding to the blurring functions specific to the camera shake in each image, the "\*" symbol and  $T$  superscript indicate the convolution and mirror operators, respectively, and  $\alpha$  is a scale factor that controls the speed of convergence. The error,  $E$ , minimized by Eq. (4.1) is the summation across all image pixels of the squared differences between measured and estimated intensity values :

$$E = \sum_{i=1}^N \|g_i - \hat{f} * h_i\|^2. \quad (4.2)$$

In camera shake removal applications, the impulse responses are estimated *a priori* from the input data and the image formation process is linear.

When applying Eq. (4.1) to the removal of "blur" caused by the finite decay length in MCWG/SPR images, however, the problem is more complex. Indeed, the image formation process is nonlinear for two reasons : (1) the system response is linear with respect to the magnitude of the electric field (as opposed to the magnitude squared measured by the camera), and (2) the system response can assume two different forms characterized by the presence or absence of "fringes" in the images, Fig. 4.1. As explained below, the proposed method first linearizes the problem before applying the optimization Eq. (4.1).

Consider the reflected light intensity,  $I_{(x)}$ , as a function of distance,  $x$ , along a metal/dielectric interface, following a step change in dielectric refractive index at  $x = 0$ . The refractive index is allowed to assume two possible values,  $n_0$  and  $n_1$ , resulting in two guided mode wavevectors,  $k_0 = k'_0 + ik_0''$  and  $k_1 = k'_1 + ik_1''$ . Let the (real) excitation light wavevector component along the interface be equal to  $k'_0$ , i.e., the excitation couples resonantly to mode  $k_0$  and couples only partially (non-resonantly) to mode  $k_1$ . For a step from  $n_1$  to  $n_0$  at  $x = 0$ , the reflected intensity for  $x \geq 0$  is given by [Berger *et al.*, 1994; Yeatman, 1996] :

$$I_{(x)} \propto |E_{\downarrow(x)}|^2 = B^2 [e^{-k_0'' x}]^2 = B^2 e^{-2k_0'' x}, \quad (4.3)$$

where  $E_{\downarrow}$  is the electric field and  $B$  is a constant that depends on the local field components (the letter "B" is used in keeping with [Berger *et al.*, 1994] and is not to be confused with the magnetic field). The down-arrow,  $\downarrow$ , in the notation indicates that the reflected light decreases for  $x \geq 0$  because the excitation couples resonantly to the guided mode  $k_0$  for  $x \geq 0$ . The distance along the interface over which the reflected light intensity falls to  $1/e$  of its maximum value is the longitudinal decay length :

$$L_{p\downarrow} = \frac{1}{2k_0''}. \quad (4.4)$$

For a step change in dielectric from  $n_0$  to  $n_1$  at  $x = 0$ , the situation is more complex [Berger *et al.*, 1994; Yeatman, 1996] :

$$I_{(x)} \propto |E_{\uparrow(x)}|^2 = B^2[1 + e^{-2k_1''x} - 2e^{-2k_1''x} \cos(k'_1 - k'_0)x], \quad (4.5)$$

where the up-arrow,  $\uparrow$ , indicates that the reflected light increases for  $x \geq 0$  as the excitation couples nonresonantly to mode  $k_1$  for  $x \geq 0$ . Equations 4.3 and 4.5 define the increasing ( $\uparrow$ ) and decreasing ( $\downarrow$ ) responses of the reflected light intensity to step changes in dielectric refractive index.

As a result of the cosine term in Eq. (4.5), "fringes" appear in the reflectivity images along edges that delimit transitions from resonant to nonresonant zones. Indeed, these fringes have been observed in high-resolution MCWG/SPR reflectivity images [Rothenhäusler *et Knoll*, 1988a]. More importantly, the presence or absence of this modulation term, conditional on the sign of the dielectric refractive index change, is an important system nonlinearity (two forms of step response). This nonlinearity can be removed by pre-filtering the images at spatial frequency  $\omega = k'_1 - k'_0$ . Since the cosine term is multiplied by an exponential in Eq. (4.5), the result is a convolution in the frequency domain. Hence, the filter used to remove the product must have a width (FWHM) equal to that of the Fourier transform of the exponential (Lorentzian) :

$$FWHM = \frac{k_1''}{2\pi}. \quad (4.6)$$

Earlier, we made the assumption that the dielectric index could only be allowed to assume two possible values. This restriction is reasonable in practice as many MCWG/SPR imaging applications aim to differentiate mainly between two types of material on the surface, for example between intra- and extra-cellular media in biological cells. Consequently, the optimal filter properties ( $\omega$  and FWHM) will be invariant across the images. As a result of the filtering operation, Eq. (4.5) reduces to :

$$I_{(x)} \propto |E_{\uparrow(x)}|^2 = B^2[1 - e^{-k_1''x}]^2 \quad (4.7)$$

with longitudinal decay length :

$$L_{p\uparrow} = \frac{1}{2k_1''}. \quad (4.8)$$

The application of Eq. (4.1) requires the impulse response,  $h_{(x)}$ , which can be obtained (to within a scale factor) by differentiating the system step response. Clearly, however, the differential of Eqs. (4.3) and (4.7) will not yield the same form of step response because



the expressions are squared. Instead, by taking the square root of the image data, the pixel values will be proportional to the magnitude of the electric field (as opposed to the magnitude squared) and the step responses,  $s_{(x)}$ , become :

$$s_{\downarrow(x)} = \sqrt{|E_{\downarrow(x)}|^2} = B e^{-k_0'' x}, \quad (4.9)$$

$$s_{\uparrow(x)} = \sqrt{|E_{\uparrow(x)}|^2} = B [1 - e^{-k_1'' x}]. \quad (4.10)$$

Taking the differential of both expressions yields the impulse responses :

$$h_{\downarrow(x)} = \frac{\partial}{\partial x} s_{\downarrow(x)} = -B k_0'' e^{-k_0'' x}, \quad (4.11)$$

$$h_{\uparrow(x)} = \frac{\partial}{\partial x} s_{\uparrow(x)} = -B k_1'' e^{-k_1'' x}. \quad (4.12)$$

For low-loss metals, the imaginary component of the mode wavevector is mainly a function of the permittivity of the metal and can thus be considered effectively independent of the properties of the dielectric [Barnes, 2006]. As a result, the imaginary component of the mode wavevector is constant across the sample ( $k_0'' \sim k_1'' = k''$ ) and the now space-invariant impulse response takes the form :

$$h_{(x)} = -(B k'') e^{-k'' x}, \quad (4.13)$$

with (unique) decay length :

$$L_p = \frac{1}{2k''}. \quad (4.14)$$

To study the performance of our method on substrates with two types of surface dielectrics, experiments were conducted on samples consisting of thick PDMS structures atop MCWG substrates in air. The MCWG were fabricated as described elsewhere [Convert *et al.*, 2012]. The mode wavevectors could thus assume two possible values, one corresponding to an infinite PDMS layer atop the MCWG and the other corresponding to an infinite air layer. The mode wavevectors were calculated using the Fresnel equations modified for complex refractive indices with the matrix transfer method to estimate the exponential delay length,  $L_p$ , filter spatial frequency,  $\omega$ , and FWHM.

Reflectivity images were acquired using a system based on a high numerical aperture objective ( $NA = 1.46$ ) and linear actuators to position the illumination/collection focal spot in the back focal plane of the objective, similar to systems developed by others [Huang *et al.*, 2007]. The focal spot was positioned at the four cardinal points about the optical

axis of the objective to acquire four reflectivity images having mode counter-propagation directions along the two orthogonal axes in the images ( $N = 4$ ).

Figure 4.1 shows a typical reflectivity image acquired with the system (sample structure : rectangular  $28 \mu\text{m} \times 140 \mu\text{m}$  cut-out in an 8-*mm*-thick PDMS film atop the MCWG). The excitation wavevector is tuned for coupling to air (dark rectangle), and the mode propagation direction is from left to right in the image. The fringes at the transition from resonant (air) to nonresonant (PDMS) coupling are clearly visible in the image on the RHS, whereas no fringes appear at the PDMS/air transition on the LHS. The graph at the bottom of Fig. 4.1 shows plots of (TOP) the normalized reflectivity values along the dotted line in the image and (BOTTOM) the corresponding model estimations.

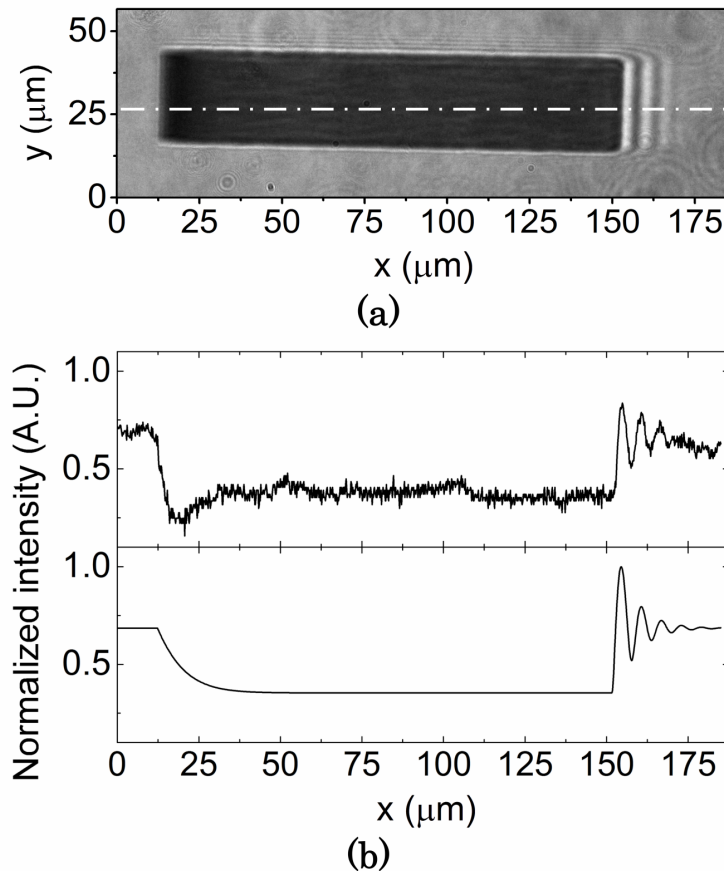


Figure 4.1 (a) Reflectivity image from a sample consisting of a PDMS film with a rectangular cutout atop a MCWG substrate, in air. The illumination is tuned to couple to air (dark rectangle). The direction of mode propagation is horizontally from the left in the image; (b) TOP : normalized reflected intensity along the dotted line in the image; (b) BOTTOM : corresponding model estimation from Eq. (4.3) for  $x < 100 \mu\text{m}$  and from Eq. (4.5) for  $x > 100 \mu\text{m}$ .

A block diagram of the method is shown at the top of Fig. 4.2. After acquisition, the four input images are coregistered to eliminate any relative lateral shift due to misalignment in the optical system, using the Matlab functions `imregtform` and `imwarp`. A Chebyshev bandstop filter, centred at  $\omega$  and of width Eq. (4.6), is then applied to the images to remove the modulation component, followed by a square root operation to make the data proportional to the magnitude of the electric field, as required for deconvolution by the impulse response function. Next, the deconvolution/minimization algorithm Eq. (4.1) is applied to the 4 images, where the number of iterations in the minimization was set to 25 after which no noticeable improvement in the result could be discerned in terms of modulation reduction and/or edge sharpness. Finally, pixels values are squared to make the data proportional to the square of the electric field magnitude anew to restore contrast.

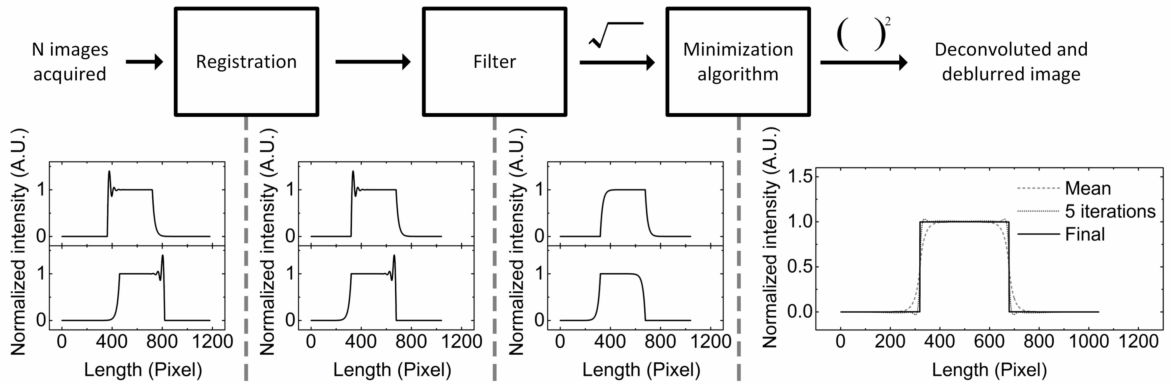


Figure 4.2 TOP : block diagram showing the sequence of operations in the proposed method (registration, filtering, square root, minimization, and square) ; BOTTOM : graphs showing the result of each operation on a line taken from two input images with counterpropagating modes. In the upper three plots, the direction of mode propagation is from right to left. In lower three plots, the direction of mode propagation is from right to left. The rightmost plot shows the result of the algorithm.

Figure 4.3 shows the result of a typical experiment where the sample is a cross-shaped cut-out in the PDMS layer atop the MCWG. The input data set is shown on the left (Figs. 4.3(a)-4.3(d)). The resulting synthesized image with improved lateral resolution is shown on the right. The distinct location of the fringes in the input images corresponding to the four different mode propagation directions is clearly seen. Note that the fringes are only present following resonant to nonresonant transitions. The graph at the bottom-right of the figure shows a plot of the intensity profile along the dotted line in input Fig. 4.3(a) and final Fig. 4.3(e), demonstrating the effective filtering of the oscillations and restoration of the edge sharpness : the distance over which the intensity changes from 10% to 90% is reduced by a factor of 6 ( $6 - 1 \mu m$ ).

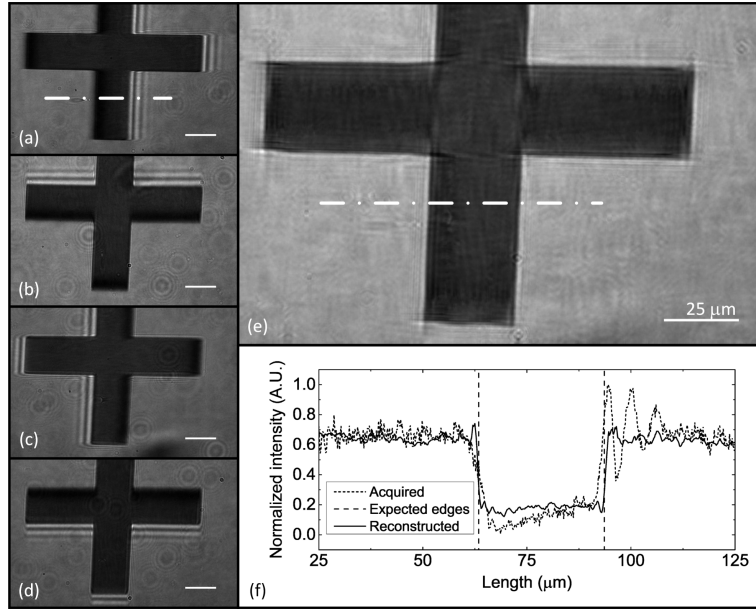


Figure 4.3 LEFT (a)-(d) : input image data set from a typical experiment where the sample is a cross-shaped cut-out in the PDMS layer atop the MCWG ; TOP RIGHT : Resulting synthesized image with improved lateral resolution after 25 iterations of Eq. (4.1) ; BOTTOM RIGHT : intensity profile along the dotted line in the input (a) and final (e) images.

In conclusion, we have demonstrated a method to improve lateral resolution in high-resolution MCWG/SPR imaging based on combining multiples images of a sample acquired with distinct guided-mode propagation directions. Using filtering and deconvolution, the method reduces the ringing and edge profile exponential degradation caused by the finite longitudinal-decay length. The method relies on knowledge of the impulse response and the frequency of the modulation (ringing) component. The relevant parameters for both can be either estimated using *a priori* knowledge of the sample or estimated directly from the images. Should the sample have more than two materials above the MCWG with different refractive indices, the images must be pre-filtered at all spatial frequencies corresponding to the differences between the real parts of the wavevectors in all possible combinations. However, since the impulse response depends only on the imaginary components of the wavevector, i.e., on the properties of the metal, it remains invariant. The method requires a minimum of 2 input images. The improvement in resolution will be commensurate with the number of input images used.

The authors are grateful for the financial support of the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC). The authors thank Dr. Thierry Courcier, Dr. Vincent Chabot, and Dr. Aurélien Duval for the many fruitful discussions.

# CHAPITRE 5

## RÉSULTATS SUR ÉCHANTILLONS CELLULAIRES

L'algorithme de restauration d'images présenté dans l'article de la section 4.1 a été validé en déconvoluant la dégradation causée par la propagation de l'onde de surface des images acquises pour restaurer des structures synthétiques. Le résultat de cette reconstruction ayant été présenté à la section précédente, ce chapitre expose les résultats de la restauration lorsqu'elle est appliquée à des images cellulaires. Tout d'abord, une étude du milieu cellulaire est présentée où les cellules ont été imagées dans deux milieux d'indice de réfraction différents pour identifier le milieu offrant le meilleur contraste dans les images. Finalement, les résultats de la restauration d'images pour des échantillons cellulaires sont présentés et comparés avec les images acquises.

### 5.1 Comparaison du milieu cellulaire

Tel que décrit à la section 3.1, la fréquence d'oscillation et le contraste des images sont fonction de la différence d'indice de réfraction lors d'une variation abrupte. Il est donc important de valider le milieu de travail à utiliser avant de valider l'algorithme sur des cellules. En effet, si les images n'offrent pas un bon contraste et qu'il n'est pas possible de filtrer les oscillations, la reconstruction générera un résultat erroné.

La plage des indices de réfraction moyens des cellules est de 1.35 – 1.40 [Liang *et al.*, 2007]. Cela implique que le passage de l'onde de surface du milieu cellulaire ( $n \approx 1.33$ ) à une cellule résulte en une variation d'indice de réfraction de 0.02 à 0.07, tandis que pour l'air ( $n = 1$ ), la variation est plutôt de 0.35 à 0.40. La différence entre ces deux variations est significative. La figure 5.1 présente la différence de contraste entre la membrane de la cellule et [milieu cellulaire (A), air (C)], ainsi que le profil d'un pas d'intensité [milieu cellulaire (B), air (D)].

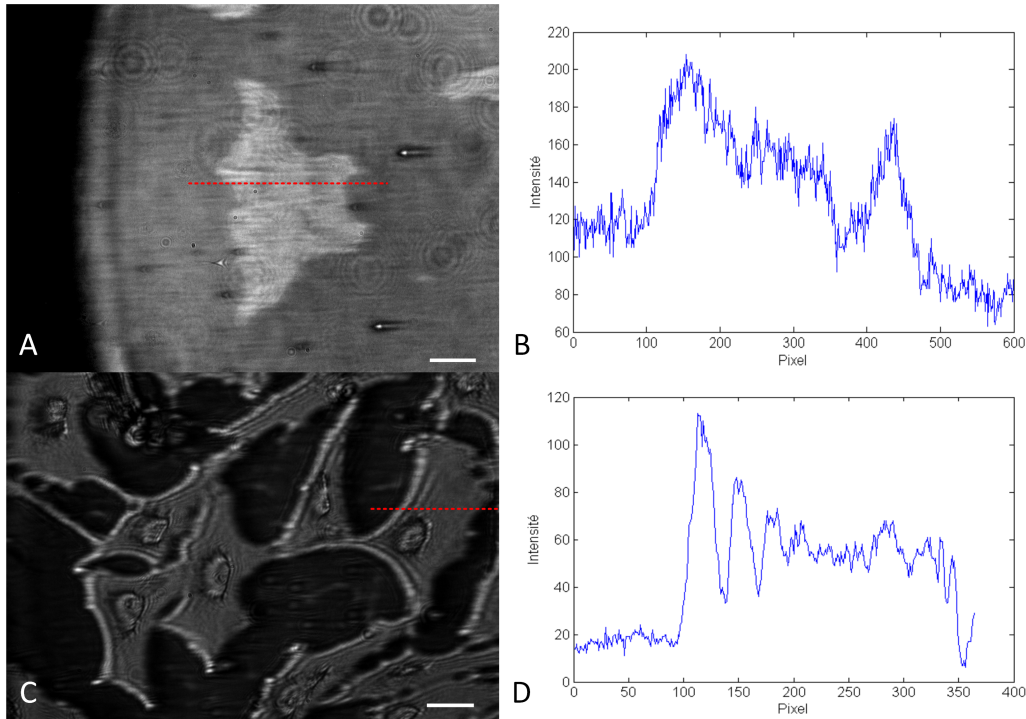


Figure 5.1 A : Contraste entre une cellule et l'eau. B : Profil d'intensité (ligne pointillée dans 5.1A). C : Contraste entre cellules et l'air. D : Profil d'intensité (ligne pointillée dans 5.1C). Contraste plus élevé pour des cellules fixées dans l'air (air : 1, milieu cellulaire :  $\sim 1.33$ , cellules :  $\sim 1.38$ ). Échelle :  $25 \mu\text{m}$ .

Les profils d'intensité associés aux deux milieux comparés à la figure 5.1 montre la dépendance entre la variation d'indice de réfraction et le contraste. Effectivement, la variation d'indice de réfraction dans la sous-figure 5.1B n'est que  $\Delta n \approx 0.05$ , ce qui résulte en un faible contraste. Les bords de la cellule sont par conséquent peu définis et les oscillations qui servent de base à la correction de la non-linéarité des images ne sont pas visibles. Par ailleurs, la sous-figure 5.1D présente deux plateaux distincts pour l'air et la cellule par son fort contraste et faible bruit, ainsi que des oscillations interprétables. L'utilisation de l'air comme milieu cellulaire a donc été choisie pour la validation de la procédure de restauration d'images cellulaires.

## 5.2 Validation sur images cellulaires

Les images restaurées par l'algorithme présentées dans cette section sont obtenues à partir d'échantillons où les cellules ont été fixées et se trouvent dans l'air. La fabrication de ces échantillons est décrite à la section 3.3. La figure 5.2 présente les quatre images acquises où la direction de la propagation de l'onde évanescente est différente, soit  $0^\circ$  (A),  $90^\circ$  (B),  $180^\circ$  (C) et  $270^\circ$  (D).

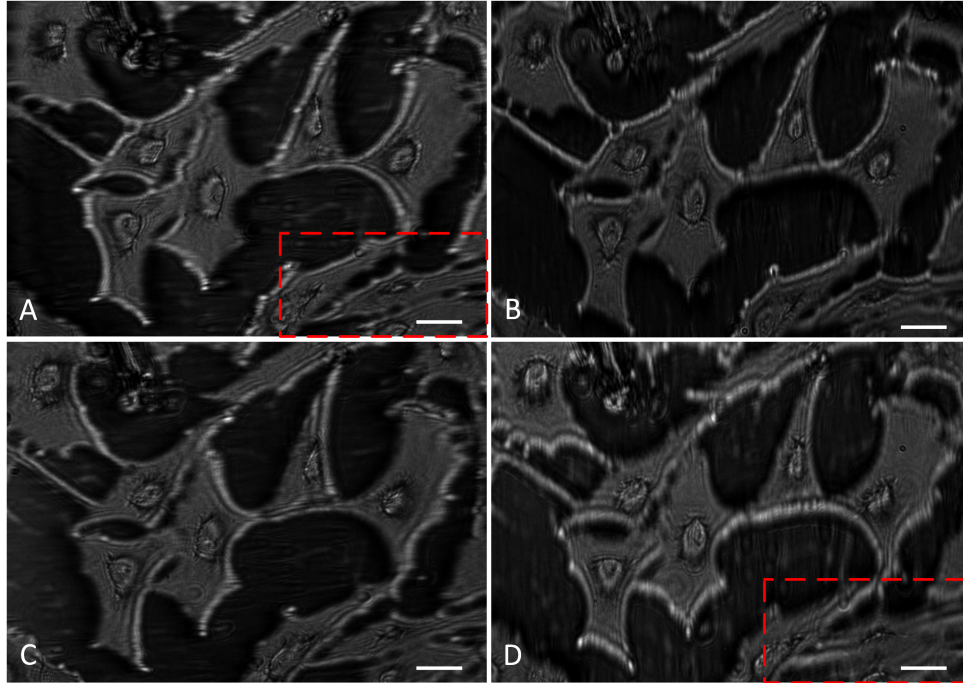


Figure 5.2 Échantillons de structures cellulaires. Directions de propagation différentes :  $0^\circ$  (A),  $90^\circ$  (B),  $180^\circ$  (C) et  $270^\circ$  (D). Encadrés rouges : détails différents selon l'orientation de la propagation de l'onde de surface. Échelle :  $25 \mu m$ .

La longueur de propagation de l'onde de surface étant supérieure aux dimensions de certaines structures internes des cellules, plusieurs détails ne sont perceptibles que pour une direction de propagation. Par exemple, sans traitement, la structure du noyau de la cellule en 5.3B ainsi que sa membrane ne sont pas identifiables, alors qu'elles le sont dans l'image 5.3A.

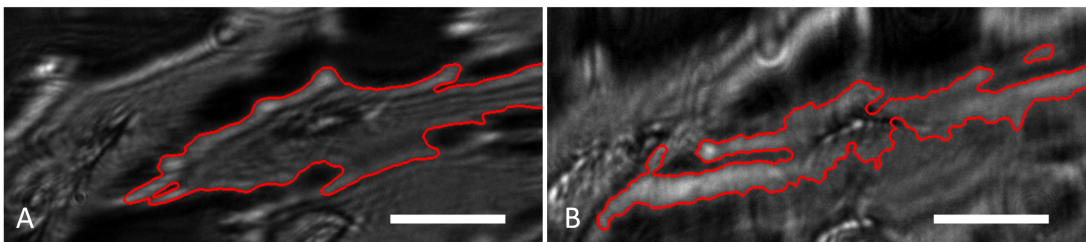


Figure 5.3 Agrandissement de cellules présentées à la figure 5.2 (Encadrés rouges. A : figure 5.2A, B : figure 5.2D). Lignes rouges : contours actifs géodésiques. Contours en B ne permettent pas d'identifier la cellule. Échelle :  $25 \mu m$ .

Cette perte de détails selon l'orientation de la propagation de l'onde de surface supporte la nécessité d'utiliser un algorithme de reconstruction d'images comme celui développé dans ce projet de recherche. Une autre spécificité des images cellulaires est la présence de deux fréquences d'oscillation, soit une pour la transition entre l'air et la membrane cellulaire, et

l'autre pour une transition entre le nucléoplasme et le cytoplasme [Oster, 1956]. Afin de s'affranchir de ces oscillations, une linéarisation du système par filtrage est nécessaire, tel que décrit dans la section 4.1. Ainsi, deux filtrages ont été effectués. La figure 5.4 présente ces deux opérations ; l'oscillation de la membrane cellulaire est premièrement filtrée (B), suivi de celle du noyau (C). Une comparaison de profil d'intensité (D) entre l'image acquise et l'image filtrée finale montre l'atténuation des oscillations présentes lors d'une transition entre l'air et la membrane cellulaire.

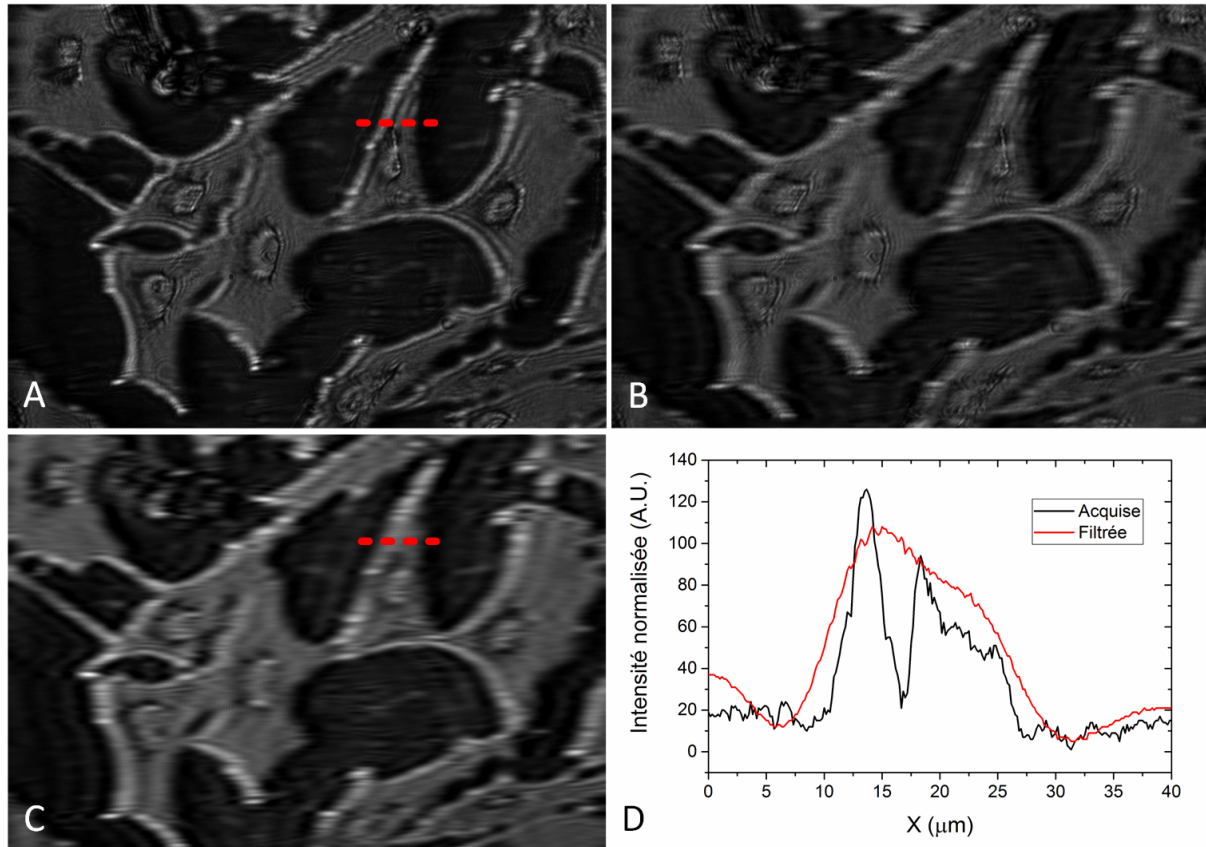


Figure 5.4 A : image initiale, B : oscillation de la membrane cellulaire filtrée, C : oscillation du noyau filtrée, D : profil d'intensité (lignes pointillées) entre l'image acquise (A) et l'image filtrée finale (C). Une atténuation de l'oscillation haute fréquence est observable. Échelle :  $25 \mu m$ .

Ensuite, l'algorithme de restauration est utilisé pour déconvoluer la PSF (propagation de l'onde de surface). Cet algorithme prend en entrée les quatre images filtrées, puis après plusieurs itérations et à partir de la médiane, retire la dégradation. Le résultat final est présenté à la figure 5.5.



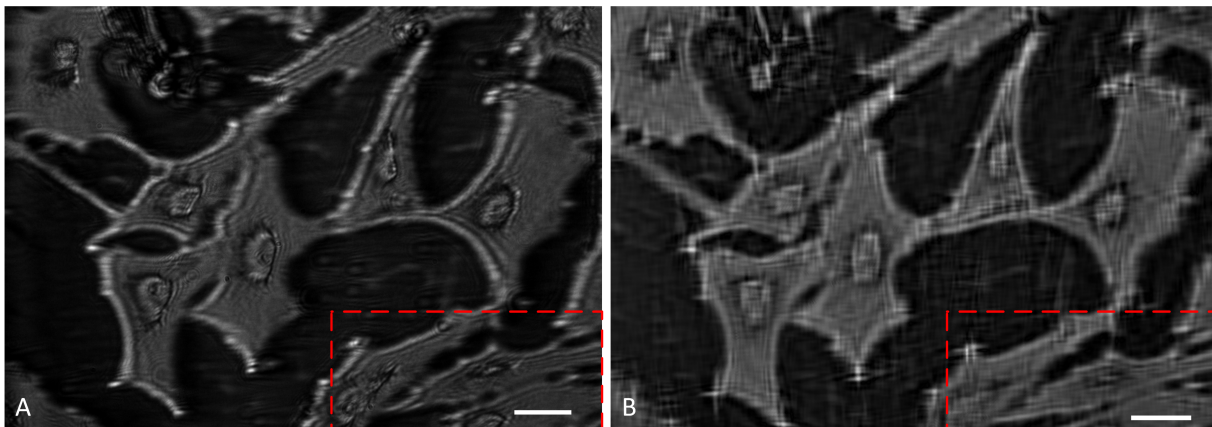


Figure 5.5 A : Image acquise. B : Image finale obtenue à l'aide de l'algorithme de restauration. Structures cellulaires partiellement reconstruite. Présence d'artefacts causés par des impuretés de la couche KMPR. Zones d'intensité lumineuse intense causent également des artefacts. Encadrés rouges : agrandissements présentés à la figure 5.6. Échelle :  $25 \mu m$ .

Les structures ont été restaurées à l'aide de l'algorithme. Effectivement, plusieurs détails sont identifiables sur la figure 5.5B et non sur l'image acquise, par exemple, la membrane cellulaire et les noyaux. Ces derniers étaient confondus avec les oscillations de la membrane cellulaire chez certaines cellules. La figure 5.6 présente la même zone agrandie qu'à la figure 5.3 pour l'image acquise (direction de propagation horizontale : gauche à droite) et l'image restaurée. Les contours actifs géodésiques en 5.6 permettent de distinguer le noyau de la cellule uniquement après restauration.

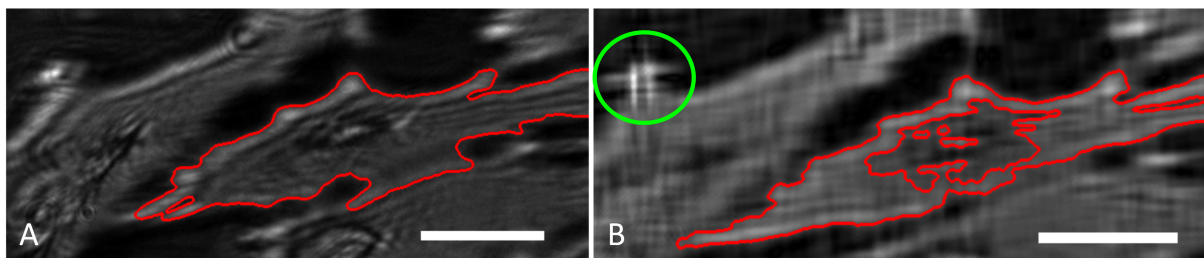


Figure 5.6 Agrandissements de la figure 5.5 où certains détails ont été restaurés. Le noyau est identifiable en B, tandis qu'il est confondu avec les oscillations en A. Cercle vert : Artefacts créés par la restauration d'images. Échelle :  $25 \mu m$ .

Cependant, la restauration d'image engendre la formation d'artefacts (cercle vert dans la figure 5.6). Ceux-ci sont causés par des parties de la membrane des cellules où l'intensité réfléchie est très intense et par une non-uniformité de la couche de KMPR résultant en des conditions de couplage variables. L'importance de ces défauts n'est pas négligeable, et la déconvolution effectuée par l'algorithme n'est plus aussi efficace. Cela résulte donc en des

artefacts en forme d'étoile à quatre branches (nombre de directions de propagation d'onde acquises). Bien que le résultat de la restauration pour les structures cellulaires n'est pas d'aussi bonne qualité que celui des structures synthétiques, l'utilisation de l'algorithme de restauration d'images a été validée auprès de l'imagerie cellulaire.

Un terme de régularisation pourrait être ajouté lors de l'étape de minimisation non-linéaire et permettrait de compenser les erreurs générées lors des multiples itérations, sans nécessiter de ressources supplémentaires. Plusieurs types de régularisation existent, soit  $L^1$ ,  $L^2$ , *Sobolev*, *Sparsity* et *Total Variation* (TV). Une étude des différents types permettra d'identifier la méthode optimale pour éliminer la création d'artefacts lors de la reconstruction d'image.

Un nombre d'images acquises supérieur à 4 offrirait plus d'information sur la morphologie des cellules imagées et permettrait de réduire la quantité d'artefacts créés par l'algorithme de restauration d'images. De plus, la moyenne des images acquises serait plus adéquate et refléterait plus fidèlement l'échantillon réel en y négligeant les défauts. Ces modifications au système d'imagerie et à l'algorithme de restauration d'images permettraient ainsi d'obtenir des résultats similaires à ceux présentés à la section 4.1, où l'image restaurée ne comporte pas d'artefacts.

## Conclusion

Ce chapitre a présenté une étude du milieu cellulaire afin d'obtenir un fort contraste dans les images, et l'application de l'algorithme de restauration d'images à des structures biologiques. L'air a été choisi comme milieu diélectrique pour y fixer les cellules, car il offre une forte variation d'indice de réfraction avec les cellules et par conséquent, un contraste élevé dans les images acquises. Par ailleurs, plusieurs détails perdus par la propagation de l'onde de surface ont été restaurés. Par contre, à la différence des images de structures synthétiques traitées, les images cellulaires restaurées présentent plusieurs artefacts causés par des zones où l'intensité réfléchie est très intense. Ainsi, du travail supplémentaire sur l'algorithme est nécessaire afin d'obtenir une meilleure qualité dans l'image restaurée.

# CHAPITRE 6

## CONCLUSION

La microscopie SPR est une méthode d'analyse qui ne nécessite pas de marquage et qui mesure quantitativement les valeurs d'indice de réfraction à la surface de l'échantillon d'intérêt. Cette méthode a été appliquée à l'étude d'interactions moléculaires et cellulaires. Sa résolution est cependant souvent un frein à son utilisation. En effet, la propagation de l'onde évanescente à la surface entraîne un étalement de l'information sur plusieurs microns voir dizaines de microns, dimensions comparables aux cellules ou structures cellulaires. L'hypothèse centrale de ce projet était qu'une image de meilleure résolution peut être obtenue en combinant des images où la direction de propagation de l'onde de surface diffère. Pour ce faire, une procédure de restauration de l'image a été proposée. Celle-ci exploite un algorithme de reconstruction d'image qui prend en entrées des images affectées par un flou qui est directionnel (une dimension) et de directions différentes. Le projet consistait donc en le développement et l'implémentation de cette procédure de restauration d'images qui déconvolue la propagation de l'onde évanescente.

### 6.1 Sommaire des travaux et atteinte des objectifs

Le projet comportait plusieurs objectifs :

1. Développement et implémentation d'une procédure de restauration d'images.
2. Validation de la procédure sur des structures synthétiques.
3. Application à de l'imagerie cellulaire.

La complétion des deux premiers objectifs est présentée dans la publication du chapitre 4. Tout d'abord, un algorithme a été développé à partir de l'équation des valeurs propres du mode TM guidé [Homola, 2006a], et permet de calculer la constante de propagation complexe pour n'importe quel guide d'onde à trois couches. Cet algorithme utilise la constante calculée et, à l'aide des équations du modèle développé par [Yeatman, 1996], calcule la fréquence de l'oscillation générée par la transition de l'onde de surface d'une zone fortement à faiblement couplée (voir figure 2.14). La PSF (décroissance exponentielle) est également déterminée par l'algorithme. Une méthode permettant de calculer les indices de réfraction composant la couche diélectrique a également été implémentée. Cette méthode utilise la

fréquence d'oscillation des franges d'interférence observée dans les images acquises et permet de traiter des échantillons de composition inconnue, comme les échantillons cellulaires. Ensuite, la non-linéarité du système causée par la propagation de l'onde évanescente est compensée en filtrant les oscillations (filtrage coupe-bande) observées dans les images afin de ne laisser que la PSF présente pour la déconvolution. Celle-ci est par la suite effectuée à l'aide d'un algorithme de minimisation non-linéaire qui utilise quatre images dont la direction de propagation est différente ( $0^\circ$ ,  $90^\circ$ ,  $180^\circ$  et  $270^\circ$ ) pour obtenir une image restaurée de meilleure qualité.

Cette procédure de restauration d'images a été validée sur des échantillons possédant des structures synthétiques. Une étape de recalage des images est nécessaire avant d'utiliser l'algorithme de restauration d'images, car une déformation des images acquises est présente et est causée par un désalignement des composantes optiques du système d'acquisition. Celui-ci est inévitable lors de l'insertion des échantillons. L'image restaurée par cette algorithme présente une amélioration de la résolution latérale d'un facteur 6, soit un passage de  $6 \mu m$  à  $1 \mu m$ .

Finalement, l'algorithme de restauration a été appliqué à l'imagerie cellulaire. Une comparaison du milieu composant la couche diélectrique (milieu cellulaire et air) a démontré qu'une plus grande différence d'indice de réfraction entre le milieu et la structure d'intérêt est préférable pour l'exécution de l'algorithme. Un contraste plus élevé est obtenu lorsque les cellules sont fixées à la surface dans l'air. Par ailleurs, bien que la présence d'imperfections dans les images cellulaires acquises occasionnent la création d'artefacts dans l'image reconstruite, plusieurs détails précédemment indistinguables ont été restaurée par l'algorithme. Ainsi, la procédure développée et implémentée dans ce projet permet d'améliorer la résolution en imagerie cellulaire également. Cependant, cette procédure peut ne pas être applicable pour des images de trop faible contraste.

## 6.2 Contributions originales des travaux

La limitation de la résolution en microscopie SPR est un inconvénient lorsque des détails ou structures à imager sont de dimensions inférieures à la longueur de propagation de l'onde de surface. Plusieurs solutions ont été proposées dans la littérature pour compenser cette dégradation. Cependant, elles ont certains désavantages comme une résolution en indice de réfraction ou temporelle plus élevée. De plus, certaines techniques proposées ne permettent pas l'exécution de balayages angulaires pouvant rendre l'étude d'échantillons biologiques difficile. La procédure de restauration d'images proposée dans ce projet conserve la dégra-

dation observée dans les images et la compense par post-traitement, tout en sauvegardant la haute résolution en indice de réfraction du système. Les travaux effectués au cours de ce projet de recherche présentent la première démonstration de post-traitement dans l'amélioration de la résolution en imagerie SPR/MCWG.

De plus, le projet de recherche a permis de démontrer l'application du modèle, développé par [Yeatman, 1996] pour la microscopie SPR, auprès de guides d'onde à trois couches. Ainsi, le modèle a été étendu pour les échantillons MCWG. Par ailleurs, l'algorithme de reconstruction employé dans ce projet est initialement utilisé pour retirer un flou directionnel dans une image occasionné par un mouvement de la caméra ou de l'objet lors de l'acquisition. L'application de l'algorithme de reconstruction pour faire la déconvolution a permis de valider l'utilisation d'un tel algorithme pour retirer une dégradation causée par des phénomènes physiques. Cet algorithme ne requiert pas d'information préalable sur les structures imagées pour effectuer son opération de déconvolution.

Ces travaux ont mené à la publication d'un article dans la revue scientifique *Optics Letters* [Banville *et al.*, 2015], ainsi qu'à la participation à une école d'été en biophotonique avec comité de sélection et à une conférence universitaire.

### 6.3 Perspectives

Afin d'améliorer la performance de la restauration d'images, il serait pertinent d'ajouter un terme de régularisation lors de l'étape de minimisation non-linéaire et d'augmenter le nombre d'images obtenues par le système d'acquisition. Ainsi, cela permettra de réduire l'importance des perturbations et de l'information erronée dans l'image restaurée, pour obtenir une image reconstruite sans présence d'artefacts. Finalement, cette procédure de restauration d'images pourra être appliquée pour l'étude de phénomènes biologiques en la combinant avec d'autres modalités d'imagerie, comme la fluorescence.



# LISTE DES RÉFÉRENCES

- Axelrod, D. (2001). Total internal reflection fluorescence microscopy in cell biology. *Traffic (Copenhagen, Denmark)*, volume 2, numéro 11, p. 764–774.
- Bally, M., Halter, M., Vörös, J. et Grandin, H. M. (2006). Optical microarray biosensing techniques. *Surface and Interface Analysis*, volume 38, numéro 11, p. 1442–1458.
- Banville, F. A., Söllradl, T., Zermatten, P.-J., Grandbois, M. et Charette, P. G. (2015). Improved resolution in SPR and MCWG microscopy by combining images acquired with distinct mode propagation directions. *Optics Letters*, volume 40, numéro 7, p. 1165–1168.
- Barnes, W. L. (2006). Surface plasmon-polariton length scales : a route to sub-wavelength optics. *Journal of Optics A : Pure and Applied Optics*, volume 8, numéro 4, p. S87–S93.
- Barnes, W. L., Dereux, A. et Ebbesen, T. W. (2003). Surface plasmon subwavelength optics. *Nature*, volume 424, numéro 6950, p. 824–830.
- Bassil, N., Maillart, E., Canva, M., Lévy, Y., Millot, M.-C., Pissard, S., Narwa, R. et Goossens, M. (2003). One hundred spots parallel monitoring of DNA interactions by SPR imaging of polymer-functionalized surfaces applied to the detection of cystic fibrosis mutations. *Sensors and Actuators B : Chemical*, volume 94, numéro 3, p. 313–323.
- Berger, C. E. H., Kooyman, R. P. H. et Greve, J. (1994). Resolution in surface plasmon microscopy. *Review of Scientific Instruments*, volume 65, numéro 9, p. 2829–2836.
- Berguiga, L., Zhang, S., Argoul, F. et Elezgaray, J. (2007). High-resolution surface-plasmon imaging in air and in water :  $V(z)$  curve and operating conditions. *Optics letters*, volume 32, numéro 5, p. 509–511.
- Beusink, J. B., Lokate, A. M. C., Besselink, G. a. J., Pruijn, G. J. M. et Schasfoort, R. B. M. (2008). Angle-scanning SPR imaging for detection of biomolecular interactions on microarrays. *Biosensors & bioelectronics*, volume 23, numéro 6, p. 839–844.
- Bousse, L. (1996). Whole cell biosensors. *Sensors and Actuators B : Chemical*, volume 34, numéro 1-3, p. 270–275.
- Busse, S., Scheumann, V., Menges, B. et Mittler, S. (2002). Sensitivity studies for specific binding reactions using the biotin/streptavidin system by evanescent optical methods. *Biosensors & bioelectronics*, volume 17, numéro 8, p. 704–710.
- Campbell, C. T. et Kim, G. (2007). SPR microscopy and its applications to high-throughput analyses of biomolecular binding events and their kinetics. *Biomaterials*, volume 28, numéro 15, p. 2380–2392.
- Chabot, V. (2013). *Plates-formes de microscopie et fluorescence par résonance de plasmons de surface appliquées à l'imagerie cellulaire*. Thèse de doctorat, Université de Sherbrooke, 153 p.

- Chabot, V., Cuerrier, C. M., Escher, E., Aimez, V., Grandbois, M. et Charette, P. G. (2009). Biosensing based on surface plasmon resonance and living cells. *Biosensors & bioelectronics*, volume 24, numéro 6, p. 1667–1673.
- Chabot, V., Miron, Y., Grandbois, M. et Charette, P. G. (2012). Long range surface plasmon resonance for increased sensitivity in living cell biosensing through greater probing depth. *Sensors and Actuators B : Chemical*, volume 174, p. 94–101.
- Convert, L., Chabot, V., Zermatten, P.-J., Hamel, R., Cloarec, J.-P., Lecomte, R., Aimez, V. et Charette, P. G. (2012). Passivation of KMPR microfluidic channels with bovine serum albumin (BSA) for improved hemocompatibility characterized with metal-clad waveguides. *Sensors and Actuators B : Chemical*, volume 173, p. 447–454.
- Giebel, K.-F., Bechinger, C., Herminghaus, S., Riedel, M., Leiderer, P., Weiland, U. et Bastmeyer, M. (1999). Imaging of Cell/Substrate Contacts of Living Cells with Surface Plasmon Resonance Microscopy. *Biophysical Journal*, volume 76, numéro 1, p. 509–516.
- Harikumar, G. et Bresler, Y. (1999). Exact image deconvolution from multiple FIR blurs. *IEEE transactions on image processing : a publication of the IEEE Signal Processing Society*, volume 8, numéro 6, p. 846–862.
- Hecht, E. (1997). *Optics*, 3<sup>e</sup> édition. Addison Wesley Longman, 694 p.
- Homola, J. (2006a). Electromagnetic theory of surface plasmons. Dans Homola, J., *Surface Plasmon Resonance Based Sensors*, Springer Series on Chemical Sensors and Biosensors, volume 4. Springer Berlin Heidelberg, p. 3–44.
- Homola, J. (2006b). *Surface Plasmon Resonance Based Sensors*, Springer Series on Chemical Sensors and Biosensors, volume 4. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, 251 p.
- Homola, J. (2008). Surface plasmon resonance sensors for detection of chemical and biological species. *Chemical reviews*, volume 108, numéro 2, p. 462–493.
- Horváth, R., Lindvold, L. et Larsen, N. (2002). Reverse-symmetry waveguides : theory and fabrication. *Applied Physics B : Lasers and Optics*, volume 74, numéro 4-5, p. 383–393.
- Huang, B., Yu, F. et Zare, R. N. (2007). Surface plasmon resonance imaging using a high numerical aperture microscope objective. *Analytical chemistry*, volume 79, numéro 7, p. 2979–2983.
- Im, W. J., Kim, B. B., Byun, J. Y., Kim, H. M., Kim, M.-G. et Shin, Y.-B. (2012). Immunosensing using a metal clad leaky waveguide biosensor for clinical diagnosis. *Sensors and Actuators B : Chemical*, volume 173, p. 288–294.
- JCBR Cell Bank (2014). *JCRB0128 TK-1*. [http://cellbank.nibio.go.jp/~cellbank/en/search\\_res\\_det.cgi?ID=1417](http://cellbank.nibio.go.jp/~cellbank/en/search_res_det.cgi?ID=1417) (page consultée le 12 décembre 2014).
- Kano, H. et Knoll, W. (2000). A scanning microscope employing localized surface-plasmon-polaritons as a sensing probe. *Optics Communications*, volume 182, numéro 1-3, p. 11–15.



- Kim, D. J. et Kim, D. (2010). Subwavelength grating-based nanoplasmonic modulation for surface plasmon resonance imaging with enhanced resolution. *Journal of the Optical Society of America B*, volume 27, numéro 6, p. 1252–1259.
- Kretschmann, E. (1972). The angular dependence and the polarisation of light emitted by surface plasmons on metals due to roughness. *Optics Communications*, volume 5, numéro 5, p. 331–336.
- Liang, X., a.Q. Liu, Lim, C., Ayi, T. et Yap, P. (2007). Determining refractive index of single living cell using an integrated microchip. *Sensors and Actuators A : Physical*, volume 133, numéro 2, p. 349–354.
- Mikhail Polyanskiy (2012). *RefractiveIndex.INFO*. <http://refractiveindex.info/?group=SCHOTT&material=N-BK7> (page consultée le 28 Mai 2013).
- Nature Education (2014). *Essentials of Cell Biology*. <http://www.nature.com/scitable/ebooks/essentials-of-cell-biology-14749010/118237871#bookContentViewAreaDivID> (page consultée le 8 décembre 2014).
- Nilsson, J. (2005). *Microtas 2004, volume 1*. Royal Society of Chemistry, Cambridge, 684 p.
- Oster, G. (1956). *Cells and Tissues : Physical Techniques in Biological Research (Volume 3)*. Academic Press, 744 p.
- Park, S. C., Park, M. K. et Kang, M. G. (2003). Super-resolution image reconstruction : A technical overview.
- Raether, H. (1997). Surface plasmons on smooth and rough surfaces and on gratings. *Springer Tracts in Modern Physics*, volume 111, p. 1–133.
- Rav-Acha, A. et Peleg, S. (2005). Two motion-blurred images are better than one. *Pattern Recognition Letters*, volume 26, numéro 3, p. 311–317.
- Rothenhäusler, B. et Knoll, W. (1988a). Interferometric determination of the complex wave vector of plasmon surface polaritons. *Journal of the Optical Society of America B*, volume 5, numéro 7, p. 1401.
- Rothenhäusler, B. et Knoll, W. (1988b). Surface-plasmon microscopy. *Nature*, volume 332, numéro 6165, p. 615–617.
- Skivesen, N., Horvath, R. et Pedersen, H. C. (2005). Optimization of metal-clad waveguide sensors. *Sensors and Actuators, B : Chemical*, volume 106, p. 668–676.
- Skivesen, N., Horvath, R., Thinggaard, S., Larsen, N. B. et Pedersen, H. C. (2007). Deep-probe metal-clad waveguide biosensors. *Biosensors & bioelectronics*, volume 22, numéro 7, p. 1282–1288.
- Somekh, M. G., Liu, S. G., Velinov, T. S. et See, C. W. (2000). Optical  $V(z)$  for high-resolution  $2\pi$  surface plasmon microscopy. *Optics Letters*, volume 25, numéro 11, p. 823–825.

- Stabler, G., Somekh, M. G. et See, C. W. (2004). High-resolution wide-field surface plasmon microscopy. *Journal of microscopy*, volume 214, numéro Pt 3, p. 328–33.
- Tanaka, T. et Yamamoto, S. (2003). Laser-scanning surface plasmon polariton resonance microscopy with multiple photodetectors. *Applied optics*, volume 42, numéro 19, p. 4002–4007.
- Wang, W., Yang, Y., Wang, S., Nagaraj, V. J., Liu, Q., Wu, J. et Tao, N. (2012). Label-free measuring and mapping of binding kinetics of membrane proteins in single living cells. *Nature chemistry*, volume 4, numéro 10, p. 846–853.
- Watanabe, K., Horiguchi, N. et Kano, H. (2007). Optimized measurement probe of the localized surface plasmon microscope by using radially polarized illumination. *Applied optics*, volume 46, numéro 22, p. 4985–4990.
- Xiao, P., Wang, X., Sun, J., Li, H., Huang, M., Chen, X. et Cao, Z. (2012). Biosensor based on hollow-core metal-cladding waveguide. *Sensors and Actuators A : Physical*, volume 183, p. 22–27.
- Yaroslavsky, L. P. et Caulfield, H. J. (1994). Deconvolution of multiple images of the same object. *Applied optics*, volume 33, numéro 11, p. 2157–2162.
- Yeatman, E. et Ash, E. (1987). Surface plasmon microscopy. *Electronics Letters*, volume 23, numéro 20, p. 1091.
- Yeatman, E. M. (1996). Resolution and sensitivity in surface plasmon microscopy and sensing. *Biosensors & bioelectronics*, volume 11, numéro 6-7, p. 635–649.
- Yeh, P. (1988). *Optical waves in layered media*, 2<sup>e</sup> édition. Wiley-Interscience, 416 p.
- Zourob, M. et Goddard, N. J. (2005). Metal clad leaky waveguides for chemical and biosensing applications. *Biosensors & bioelectronics*, volume 20, numéro 9, p. 1718–1727.
- Zourob, M., Mohr, S., Brown, B. J., Fielden, P. R., McDonnell, M. et Goddard, N. J. (2003). The development of a metal clad leaky waveguide sensor for the detection of particles. *Sensors and Actuators B : Chemical*, volume 90, numéro 1-3, p. 296–307.
- Zourob, M., Mohr, S., Brown, B. J. T., Fielden, P. R., McDonnell, M. B. et Goddard, N. J. (2005). Bacteria detection using disposable optical leaky waveguide sensors. *Biosensors & bioelectronics*, volume 21, numéro 2, p. 293–302.



