



# Sonde Optique Ultra-Résolue pour Imagerie de Surface (SOURIS)

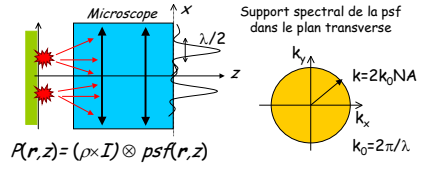
## 1. Principe de l'illumination structurée

Illuminer l'échantillon avec un champ contenant de hautes fréquences spatiales permet d'améliorer la résolution spatiale du microscope.

### Application à la microscopie de fluorescence en réflexion totale interne (TIRFM)

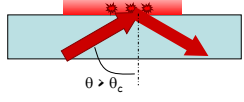
La résolution spatiale est limitée par la diffraction de la lumière.

$P(r,z)$ : intensité détectée  
 $\rho$ : densité de fluorophores  
 $I$ : intensité du champ d'illumination  
 $psf(r,z)$ : réponse du microscope

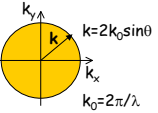


#### TIRFM standard

$$I(r,0) = I_0$$



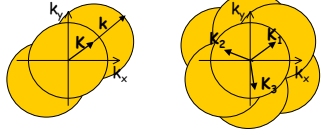
Le domaine de fréquences spatiales accessibles est borné par la psf.



$$P(k) \propto \rho(k) \times psf(k)$$

#### TIRFM en ondes stationnaires (SW-TIRFM)

$$I(r,0) = I_0 [1 + \cos(\mathbf{K} \cdot \mathbf{r} + \Phi)] \quad K = 2nk_0 \sin\theta$$



$$P(k) \propto \rho(k) \times [psf(k) + \alpha psf(k+K) + \beta psf(k-K)]$$

### Méthode de reconstruction des images

N images  $P^l$  sont obtenues avec N intensités d'illumination  $I^l$ . La densité de fluorophores est estimée itérativement de sorte à minimiser la fonction coût F. Un algorithme de gradient conjugué est utilisé pour résoudre ce problème linéaire d'inversion.

$$P(r) = (\rho \times I^l) \otimes psf, \quad l=1, \dots, N \quad F(\rho_n) = \sum_{l=1}^N \|P^l - (\rho_n \times I^l)\| \otimes psf \|^2 / \sum_{l=1}^N \|P^l\|^2$$

**Résultat** : résolution transverse améliorée d'un facteur 2 par rapport au TIRFM standard.

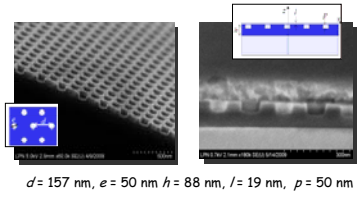
**Limite** : résolution transverse toujours inférieure à  $0.6\lambda/2n$  ( $n$  = indice de réfraction du substrat).

**Solution** : Eclairer l'échantillon par une grille de lumière de période inférieure à la limite de diffraction ( $\lambda/2n$ ), générée grâce à la structuration périodique du substrat.

## 2. Structuration périodique du substrat

Réseaux résonants = guide d'onde + structure périodique

Guide d'onde : couche d'indice de réfraction élevé\* portant des modes guidés de haute fréquence spatiale\*\* dans le visible et l'infrarouge.  
 \* (silicium,  $n_{Si} = 4.0 + 0.1i$  à 630 nm)  
 \*\* ( $K_{mode} \approx 3.5k_0$  à 630 nm)



Réseaux 2D de motif périodique triangulaire et de période  $d < \lambda/3$ .

## 3. Microscopie assistée par réseau résonant

Le réseau résonant permet de créer un champ possédant de hautes fréquences spatiales sur toute la surface du substrat.

### Simulation de l'intensité du champ au-dessus du réseau

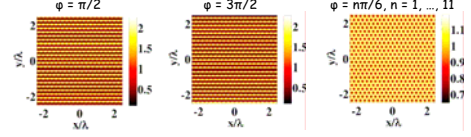
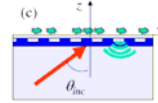
Illumination par une onde plane polarisée  $s$

L'intensité à  $z=0$  est modélisée par une série de Rayleigh où  $K_{n,m}$  sont les modes propres du réseau.

$$I^l(\mathbf{r}) = \left| \sum_{n,m \in \mathbb{Z}^2} A_{n,m} e^{i\mathbf{K}_{n,m} \cdot \mathbf{r}} \right|^2$$

Excitation résonante à  $\theta_{inc} = 65^\circ$  et  $\varphi = \pi/2$  (angle azimutal) :  
 → les modes dominants  $K_{0,0}$  et  $K_{-1,0}$  forment une figure d'interférence de période  $d\sqrt{3}/2$ .

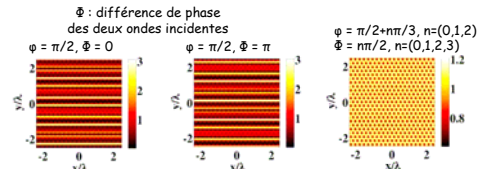
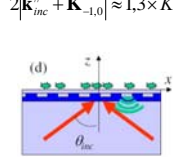
$$|\mathbf{k}_{inc}^{\parallel} + \mathbf{K}_{-1,0}| \approx k_{mode} \quad K_{-1,0} \approx \frac{4\pi}{d\sqrt{3}}$$



Illumination par deux ondes planes polarisées  $s$

L'intensité au-dessus du réseau n'est plus périodique. Composantes de fréquence spatiale la plus élevée :

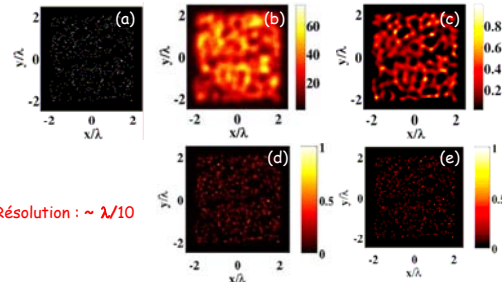
$$I^l(\mathbf{r}) \approx \left| A_{0,0} \cos(\mathbf{k}_{inc} \cdot \mathbf{r} + \frac{\varphi}{2}) + A_{-1,0} \cos(\mathbf{K}_{-1,0} \cdot \mathbf{r} + \frac{\varphi}{2}) \right|^2$$



- Fréquences spatiales du champ d'illumination définies par la périodicité du réseau
- Structures de hautes fréquences spatiales très contrastées
- Rotation et translation du champ structuré par rapport au réseau
- Intensité moyenne quasi-homogène sur toutes les illuminations

### Reconstruction de données numériques

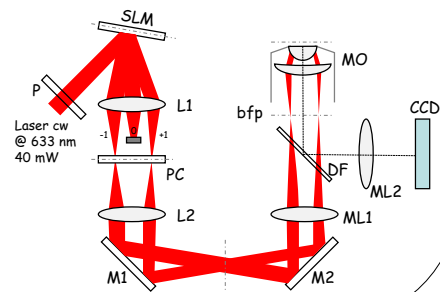
(a) Densité de fluorophores, (b) simulation de l'image détectée sur la caméra CCD sous illumination homogène, (c) reconstruction à partir de l'image (b), (d) reconstruction à partir des images réalisées en SW-TIRFM, (e) reconstruction à partir des images réalisées sur le substrat-réseau sous illumination à deux ondes planes.



Résolution : ~  $\lambda/10$

### Développement instrumental

Deux ondes planes sont créées par diffraction d'un faisceau laser sur un modulateur de phase à cristaux liquides (SLM) et focalisation des ordres +1 et -1 dans le plan focal arrière de l'objectif (bfp). Les angles  $\theta_{inc}$  et  $\varphi$  et la phase  $\Phi$  sont contrôlés par le SLM. La polarisation  $s$  est obtenue grâce au convertisseur de polarisation azimutale (PC).



(2008) A. Sentenac, K. Belkebir, H. Giovannini and P. Chaumet 'Sub-diffraction resolution in Total Internal Reflection Fluorescence Microscopy with a grating substrate', Optics Letters, 33, 255-257