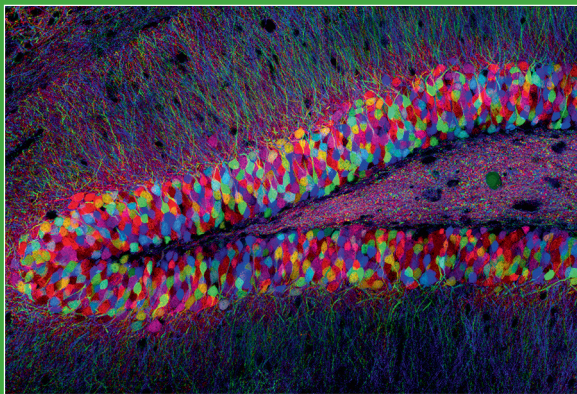


IMAGER L'INVISIBLE AVEC LA LUMIÈRE

COMMENT L'OPTIQUE
MODERNE RÉVOLUTIONNE
L'IMAGERIE DU VIVANT



SYLVAIN GIGAN
ET CATHIE VENTALON,
COORD.

Sylvain Gigan et
Cathie Ventalon, Coord.

Imager l'invisible avec la lumière

Comment l'optique moderne
révolutionne l'imagerie du vivant

SAVOIRS ACTUELS

EDP Sciences/CNRS ÉDITIONS

Dans la même collection

Groupes de symétrie en physique

Jean Zinn-Justin

Symétries continues

Franck Laloë

Plasmas créés par laser – Généralités et applications choisies

Patrick Mora

Physique de la turbulence – Des tourbillons aux ondes

Sébastien Galtier

Le temps dans la géolocalisation par satellites

Pierre Spagnou et Sébastien Trilles

Physique quantique, information et calcul – Des concepts aux applications

Pascal Degiovanni, Natacha Portier, Clément Cabart, Alexandre Feller et

Benjamin Roussel

Théorie statistique des champs – Tomes I et II

François David

Mécanique quantique – Tomes I, II et III

Claude Cohen-Tannoudji, Bernard Diu et Franck Laloë

Retrouvez tous nos ouvrages et nos collections sur

<http://laboutique.edpsciences.fr>

Illustration de couverture : Image enregistrée par un microscope de fluorescence d'une coupe de l'hippocampe issue d'une souris brainbow. Grâce à un marquage génétique, chaque neurone est marqué avec une couleur choisie aléatoirement parmi une palette d'une centaine de couleurs, ce qui permet de tracer ses prolongements (axones et dendrites) au sein de la tranche. L'hippocampe est une région du cerveau impliquée dans le codage de la mémoire. Crédit : Image de Tamily Weissman. La souris Brainbow a été produite par Jean Livet, Joshua Sanes et Jeff Lichtman.

Imprimé en France

© 2023, EDP Sciences, 17, avenue du Hoggar, BP 112, Parc d'activités de Courtaboeuf, 91 944 Les Ulis Cedex A

et

CNRS Éditions, 15, rue Malebranche, 75005 Paris.

Tous droits de traduction, d'adaptation et de reproduction par tous procédés réservés pour tous pays. Toute reproduction ou représentation intégrale ou partielle, par quelque procédé que ce soit, des pages publiées dans le présent ouvrage, faite sans l'autorisation de l'éditeur est illicite et constitue une contrefaçon. Seules sont autorisées, d'une part, les reproductions strictement réservées à l'usage privé du copiste et non destinées à une utilisation collective, et d'autre part, les courtes citations justifiées par le caractère scientifique ou d'information de l'œuvre dans laquelle elles sont incorporées (art. L. 122-4, L. 122-5 et L. 335-2 du Code de la propriété intellectuelle). Des photocopies payantes peuvent être réalisées avec l'accord de l'éditeur. S'adresser au : Centre français d'exploitation du droit de copie, 3, rue Hautefeuille, 75006 Paris. Tél. : 01 43 26 95 35.

EDP Sciences

ISBN (papier) : 978-2-7598-2654-4 ISBN (ebook) : 978-2-7598-2655-1

CNRS éditions

ISBN (papier) : 978-2-271-14479-9 ISBN (ebook) : 978-2-271-14481-2

Table des matières

Introduction générale	vii
1 Imager, résoudre et agrandir : le microscope	1
1.1 Une vision unifiée des systèmes d'imagerie optique	1
1.1.1 Introduction : du microscope au lecteur DVD	1
1.1.2 Microscopie plein champ et à balayage	3
1.1.3 Réciprocité	4
1.2 Le microscope à balayage	5
1.2.1 Formation de l'image	5
1.2.2 La résolution	7
1.2.3 Le grandissement	10
1.3 Les nouvelles microscopies optiques	10
1.3.1 Amélioration du contraste	11
1.3.2 Amélioration de la résolution	14
1.4 Conclusion	16
2 Optique adaptative	19
2.1 Formation d'images	19
2.1.1 L'optique géométrique	19
2.1.2 La diffraction	22
2.2 Aberrations	23
2.2.1 Aberrations optiques	23
2.2.2 Milieux non homogènes aberrants	26
2.2.3 Qualité des images	27
2.3 Optique adaptative	27
2.3.1 Correction de surface d'onde	29
2.3.2 Mesure de surface d'onde	31
2.3.3 Etoile guide	33
2.4 Optique adaptative en astronomie	34
2.5 Optique adaptative pour les applications biomédicales	38
2.6 Conclusion	41
3 Imager en milieux diffusants	45
3.1 Milieux diffusants	45
3.1.1 Lumière balistique, diffusion simple et multiple	45
3.1.2 Ordre de grandeur en biologie	46

3.1.3	Imagerie balistique	47
3.2	Imager avec la lumière diffuse	49
3.2.1	Le speckle	50
3.2.2	Le contrôle de front d'onde	51
3.2.3	La conjugaison de phase	52
3.2.4	Optimisation	53
3.2.5	Matrice de transmission	55
3.2.6	Imager grâce au contrôle de front d'onde	57
4	Holographie	63
4.1	Introduction à l'holographie	64
4.1.1	Tridimensionnalité ou stéréoscopie ?	64
4.1.2	Enregistrer ou restituer ?	66
4.1.3	Phase des ondes	67
4.1.4	Notion de cohérence	69
4.2	Principe de l'holographie	70
4.2.1	L'holographie : enregistrement	70
4.2.2	Restitution analogique de l'hologramme	72
4.3	Holographie numérique	74
4.3.1	Configuration expérimentales	74
4.3.2	Reconstruction numérique	74
4.4	Applications en microscopie	77
4.4.1	Refocalisation numérique et suivi d'objets.	77
4.4.2	Imagerie holographique doppler	78
4.4.3	Imagerie de phase quantitative	80
4.5	La projection holographique en microscopie et en biologie	87
4.5.1	Hologrammes de synthèse	87
4.5.2	Projection dynamique de motifs optiques	87
4.5.3	Applications optogénétiques	88
4.6	Conclusion	96
5	Microscopie de Fluorescence	99
5.1	Fluorescence et marqueurs fluorescents pour la biologie	100
5.1.1	Qu'est-ce que la fluorescence ?	100
5.1.2	Les protéines fluorescentes et leurs applications en biologie	101
5.2	Microscopie plein champ conventionnelle	104
5.2.1	Architecture et grandissement du microscope plein champ	105
5.2.2	Définition de la PSF et résolution latérale	106
5.2.3	Forme de la PSF dans les 3 dimensions spatiales	107
5.2.4	Formation des images	108
5.2.5	Le problème du fond	111
5.2.6	Une application de la microscopie plein champ en neurosciences	112
5.2.7	Conclusion	114
5.3	Microscopies à balayage laser	114
5.3.1	Microscopie confocale	114
5.3.2	Microscopie à deux photons	119

5.4	Techniques de microscopie rapides à sectionnement optique	123
5.4.1	Microscopie confocale à disque rotatif	125
5.4.2	Microscopie à feuille de lumière	125
5.5	Conclusion	129

Conclusion	133
-------------------	------------

Remerciements	135
----------------------	------------

Les auteurs	137
--------------------	------------

Sponsors	139
-----------------	------------

Introduction générale

Cathie Ventalon et Sylvain Gigan

Dans cette introduction générale, nous présentons un bref historique du développement des instruments d'imagerie optique à travers les siècles, en montrant les étapes marquantes qui ont conduit à l'émergence des différents domaines d'imagerie moderne faisant l'objet de ce livre.

1. L'œil : un instrument optique naturel

Nous disposons tous d'un instrument optique extrêmement évolué : notre œil (figure 1). Résultat de millions d'années d'évolution, celui-ci compte une lentille ajustable (la cornée et le cristallin), un diaphragme (l'iris) permettant de s'adapter à la luminosité ambiante, et un détecteur (la rétine) comptant une grande densité de photorécepteurs permettant d'enregistrer une image et de la transmettre au cerveau. La résolution de l'œil, sa dynamique et sa sensibilité sont exceptionnelles. Néanmoins, l'œil n'est pas un instrument parfait : il faut parfois corriger les défauts de l'optique par des lunettes permettant de compenser les imperfections de la cornée (astigmatisme par exemple) et les défauts de mise au point (myopie, hypermétropie ou presbytie). De plus, la résolution de l'œil reste limitée par la taille de la pupille ; elle est typiquement d'une centaine de microns (un dixième de millimètre) à une distance de 35cm pour une acuité visuelle de 10/10.. Enfin, nous ne voyons qu'une petite partie du spectre lumineux : le domaine dit visible, correspondant aux longueurs d'onde allant d'environ 400 nm (le bleu) à 700 nm (le rouge). L'infrarouge, l'ultraviolet, porteurs de riches informations, nous sont invisibles.

2. Les premiers pas des instruments d'imagerie

Dès l'Antiquité, l'utilisation de surface courbes pour grossir l'image d'un objet ou focaliser la lumière a été empiriquement mis en pratique. En Grèce, par exemple, on polissait des cailloux transparents pour obtenir une image grossie : l'ancêtre de notre loupe. Archimède, quant à lui, utilisait un miroir parabolique

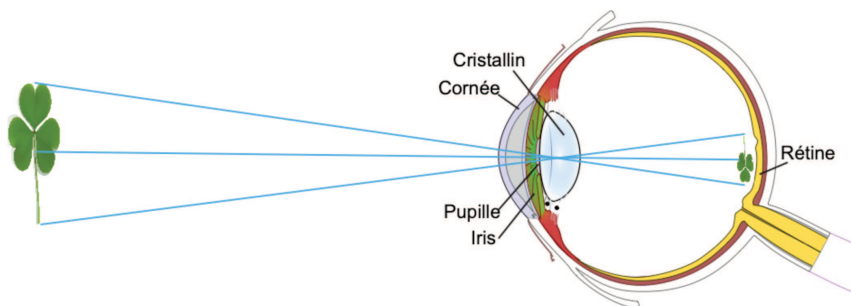


FIG. 1 – Formation d'image avec l'œil.

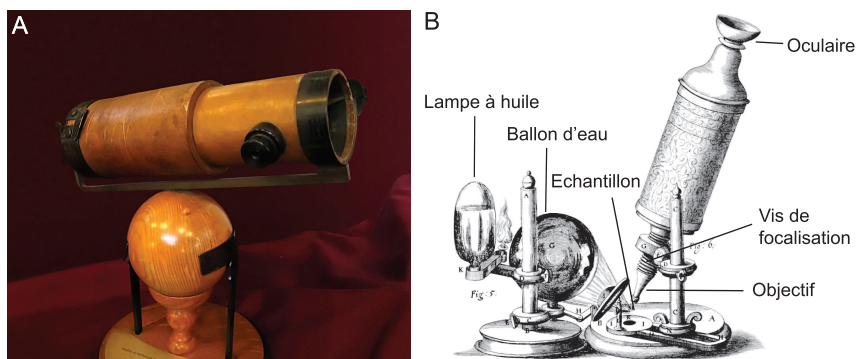


FIG. 2 – A) Réplique du télescope de 6 pouces qu'Isaac Newton présenta à la Royal Society en 1672, et située au musée Whipple d'histoire des sciences à Cambridge. Crédit : Andrew Dunn, Novembre 2004. B) Schéma du microscope de Hooke, tiré de son livre *Micrographia* (1665).

pour concentrer les rayons du soleil et ainsi brûler les voiles des bateaux assiégeant Syracuse.

L'utilisation d'instruments optiques pour voir des détails invisibles à l'œil nu a vu un tournant au début du XVII^e siècle avec l'invention de la lunette astronomique qui a permis d'observer les cratères de la lune et de découvrir les lunes de Jupiter. Peu après, en 1665, Hooke réalisa le premier microscope comprenant une lentille grossissante et un oculaire, ce qui permit d'observer les cellules pour la première fois (figure 2).

3. Diffraction et aberrations, de l'optique géométrique à l'optique ondulatoire

Si ces instruments permettaient de grossir les objets lointains ou petits, ainsi que de distinguer des détails invisibles à l'œil nu, ils n'en donnaient pas moins

des images extrêmement déformées et souvent floues, à part au centre du champ (comme avec une loupe). En effet, en optique géométrique, un système optique comme un microscope est capable de faire une image nette à condition qu'il puisse faire converger tous les rayons lumineux issus d'un point objet vers un point image, condition qu'on appelle le stigmatisme. Pour des rayons lumineux peu inclinés par rapport à l'axe optique, cette condition nécessite des surfaces parfaitement sphériques, mais les défauts de surfaces ne permettaient de remplir cette condition que très imparfaitement. Ces imperfections sont appelées aberrations géométriques. Une autre limitation vient également du fait que les optiques ne se comportent pas de la même manière pour différentes longueurs d'ondes, induisant des aberrations dites chromatiques.

Des efforts importants ont été fournis pour améliorer la qualité des optiques. Des surfaces parfaitement sphériques ont pu être polies grâce à des méthodes mécaniques. Malheureusement, lorsque l'on veut obtenir une image agrandie à haute résolution, on doit utiliser des angles d'incidence pour la lumière les plus grands possible : la condition des rayons peu inclinés n'est plus valable, et une optique sphérique, même parfaite, introduit des aberrations.

Les microscopes se sont donc perfectionnés au cours du XIX^e et XX^e siècle, au travers des progrès techniques, d'une part sur la qualité des optiques et des surfaces, d'autre part via l'utilisation dans les objectifs d'une série de lentilles qui, précisément choisies, permettent de compenser globalement les aberrations tant géométriques que chromatiques, et d'obtenir des grossissements et des champs de vues plus étendus. Ces progrès techniques ont été indissociables des progrès en calculs, permettant de concevoir de manière rigoureuse les meilleurs instruments. Plus récemment, la possibilité de fabriquer des optiques avec des surfaces asphériques voire arbitraires permet d'avoir des optiques quasiment parfaites et d'arriver à des résolutions aux limites physiques de la diffraction, c'est-à-dire à une fraction de la longueur d'onde.

4. Révéler différentes informations avec la lumière : les différents contrastes

Naturellement, l'image obtenue dans un télescope ou un microscope est une image directe de l'échantillon, formée dans l'œil. Si l'objet est lumineux, comme une étoile, on voit un point brillant. Si un milieu, telle une cellule, est semi-transparent ou semi-réfléchissant et éclairé par une lampe comme dans un microscope de Hooke, on voit une image correspondant à la réflexion ou la transmission locale de l'objet.

Néanmoins, certains objets sont invisibles lorsqu'on les regarde ainsi. Or, la lumière est à même de révéler un grand nombre d'informations sur les objets qu'on observe, dont la transmission directe, si elle est la plus évidente, n'est qu'un exemple parmi d'autres. On parle techniquement de différents « contrastes » optiques, et on verra que chaque contraste est à même de révéler des informations différentes et complémentaires.

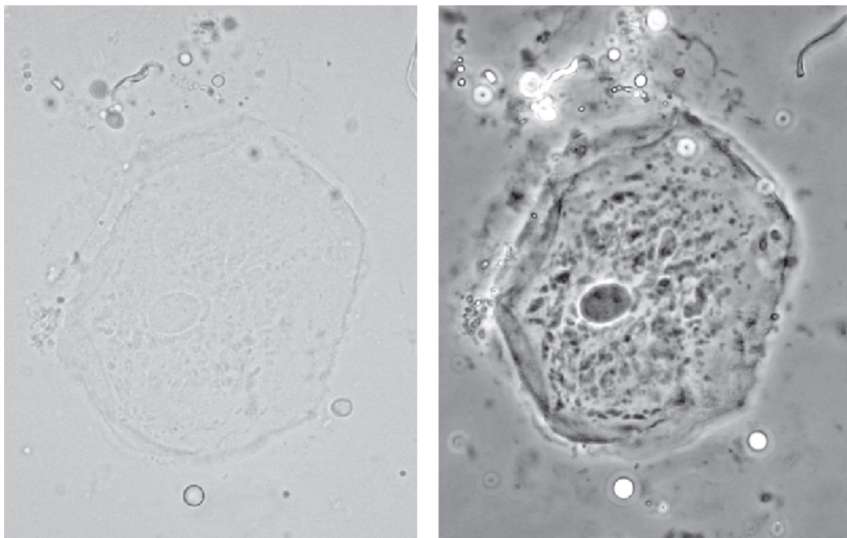


FIG. 3 – Images de cellules réalisées par microscopie plein champ en transmission (à gauche) et par microscopie par contraste de phase (à droite).

Par exemple, une simple cellule réfléchit très peu et est quasiment transparente (figure 4, à gauche). Cependant, une information très intéressante est contenue dans la phase (ou retard) de l'onde lumineuse qui l'a traversée, qui est plus ou moins affectée lors la traversée de l'échantillon en fonction de l'indice de réfraction ou de l'épaisseur locale. Or, cette phase n'est pas directement visible sur un détecteur ou à l'œil, qui n'est sensible qu'à l'intensité. Pour révéler la phase, il est nécessaire de faire une interférence, qui va transformer ce petit retard de l'onde, en interférant avec une onde de référence, en variation d'intensité. Différentes méthodes utilisant des masques ou des cristaux placés entre l'objectif et l'œil ont ainsi été introduites, en particulier par Zernike en 1930 (figure 3, à droite). Cette invention lui vaudra le prix Nobel en 1953 grâce à son intérêt considérable en biologie cellulaire.

On peut aussi ajouter chimiquement des produits permettant de colorer spécifiquement certains tissus ou structures pour mieux les révéler. C'est ainsi que la coloration des cellules nerveuses introduite par Golgi en 1873, permit plus tard à Santiago Ramon y Cajal de mettre en évidence la structure du cerveau et les connexions neuronales, qui lui vaudront le prix Nobel de médecine en 1906 (figure 4).

Un autre contraste d'une importance majeure en imagerie optique est la fluorescence, c'est-à-dire la capacité d'un échantillon d'absorber, et en fonction de la composition chimique, de réémettre de la lumière à une longueur d'onde différente. Ce processus est donc révélateur de la composition chimique et il donne une information extrêmement riche, très différente de la phase ou de la transmission de l'échantillon. En pratique, on peut simplement

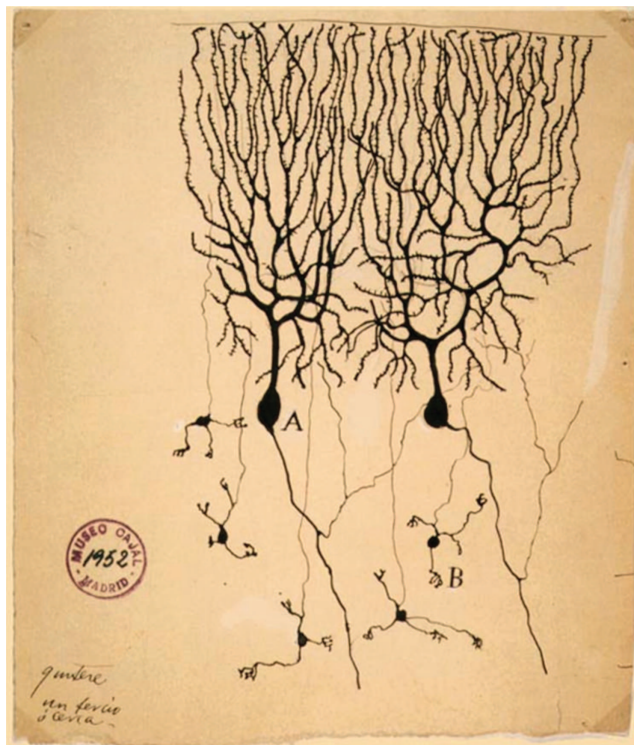


FIG. 4 – Dessins de cellules de Purkinje (A) et de cellules granulaires (B) du cervelet de pigeon observées par Santiago Ramón y Cajal (1899, Instituto Cajal, Madrid, Espagne).

éclairer un échantillon dans un microscope et éliminer à l'aide d'un filtre spectral (dit « dichroïque ») la lumière incidente, pour révéler uniquement la lumière émise par fluorescence. Si la plupart des cellules sont naturellement fluorescentes, en particulier grâce aux protéines qui les composent, les progrès de la chimie ont rapidement permis d'utiliser des processus dit de « marquage fluorescent » où on injecte des composés se fixant spécifiquement par exemple dans le noyau ou corps cellulaire, permettant de révéler spécifiquement ces structures.

5. Les révolutions récentes qui ont bénéficié à l'imagerie optique

L'imagerie optique, au milieu du XX^e siècle, est donc une science mature ayant bénéficié des progrès de la révolution scientifique du XIX^e siècle, que ce soit en physique (théorie ondulatoire, électromagnétisme, polarisation, etc.), en

mathématique (progrès du calcul intégral) ou en chimie. Son impact, en astronomie comme en biologie, est considérable.

Néanmoins, dans la seconde moitié du XX^e siècle, une série d'avancées scientifiques et techniques ont encore eu un impact considérable. La physique quantique a permis l'émergence du laser dans les années 1960, l'électronique a permis l'arrivée des détecteurs digitaux (en particulier les caméras) mais aussi le contrôle du front d'onde et le traitement numérique de l'information, et les progrès en biotechnologie ont permis l'émergence de nouveaux moyens de marquage fluorescent.

Ces avancées scientifiques, à leur tour, ont révolutionné l'imagerie optique. Le laser, comme source d'éclairage extrêmement focalisé et monochromatique, a permis par exemple de développer le microscope confocal à balayage (voir chapitre 5), remplaçant l'imagerie plein champ pour de nombreuses applications. Le développement de caméras extrêmement sensibles comportant un nombre de pixels phénoménal (plusieurs millions) a permis d'augmenter notablement la sensibilité et la taille du champ observé de nombreuses techniques d'imagerie. Couplées à l'utilisation des lasers, ces caméras ont également permis le développement de l'holographie numérique, qui a son tour a permis l'émergence de nouvelles techniques d'imagerie tridimensionnelles (chapitre 4). Par ailleurs, la capacité des lasers à concentrer la lumière spatialement et temporellement et d'obtenir des puissances lumineuses localement très importantes a permis l'émergence de l'optique non-linéaire. Celle-ci est utile en microscopie de fluorescence pour imager en profondeur (voir chapitre 5), mais a également ouvert la possibilité de battre la limite classique de diffraction : c'est le développement de la super-résolution, permettant de distinguer des structures subcellulaires de taille très inférieures à la longueur d'onde de la lumière (quelques nm) (chapitre 1). De plus, les nouveaux outils de contrôle de front d'onde et l'émergence des processeurs rapides ouvrent la possibilité de corriger les aberrations des tissus et d'imager à plus grande profondeur (chapitres 2 et 3). Finalement, les progrès en biotechnologie ont permis de développer des marqueurs biologiques toujours plus sensibles et précis, comme la GFP ou Green Fluorescent Protein, dont la découverte a valu le prix Nobel de Chimie à Osamu Shimomura, Roger Tsien et Martin Chalfie en 2008. Les organismes et les cellules vivantes peuvent être modifiés génétiquement de manière à ce qu'ils synthétisent eux-mêmes ces protéines fluorescentes de façon extrêmement spécifique et ciblée, ce qui a également révolutionné le champ de la biologie et la microscopie (chapitre 5).

Ainsi, ce livre présente un panorama (que nous avons souhaité abordable pour le curieux éclairé) de l'imagerie optique moderne dans sa diversité, en se concentrant malgré tout sur son champ d'application peut-être le plus fascinant : l'imagerie biologique.

Chapitre 1

Imager, résoudre et agrandir : le microscope

Anne Sentenac et Rémi Carminati

1.1 Une vision unifiée des systèmes d'imagerie optique

1.1.1 Introduction : du microscope au lecteur DVD

Le microscope optique est un appareil relativement bien connu. L'échantillon, positionné entre deux lames de verre, est éclairé par la lumière d'une lampe et l'on collecte la lumière transmise à travers une ou plusieurs lentilles (ou objectif), soit avec l'oeil soit avec une caméra. Nous avons tous en tête l'image agrandie d'un morceau de feuille ou d'un insecte obtenue grâce à un microscope, comme sur la figure 1.1. Elle nous permet de voir des détails étonnants, invisibles à l'oeil nu, comme les fines nervures de la feuille ou les poils sur les pattes d'une mouche. Mais serait-il possible d'observer des structures encore plus petites, comme les molécules formant les cellules ? Hélas non, même en augmentant le grandissement du microscope et en utilisant les meilleurs objectifs, les structures inférieures à 300 nm restent désespérément floues, comme si nous avions simplement agrandi l'image directement sur l'ordinateur. Nous sommes là face à une limite fondamentale !

Cette limite se retrouve dans un autre appareil du quotidien (du moins pour les plus âgés d'entre nous) : le lecteur de DVD. Ce dernier est capable d'extraire des informations d'un disque dont la surface nous paraît *a priori* totalement uniforme. Il est donc capable de distinguer des structures invisibles à l'oeil nu, comme un microscope ! Son principe de fonctionnement est très simple et schématisé sur la figure 1.2 : le disque est balayé par un petit spot lumineux (formé en focalisant un faisceau laser à l'aide d'une lentille) et un détecteur capte la lumière réfléchie. La surface naturellement réfléchissante du DVD est parsemée de trous sub-micrométriques absorbants. L'intensité mesurée par le

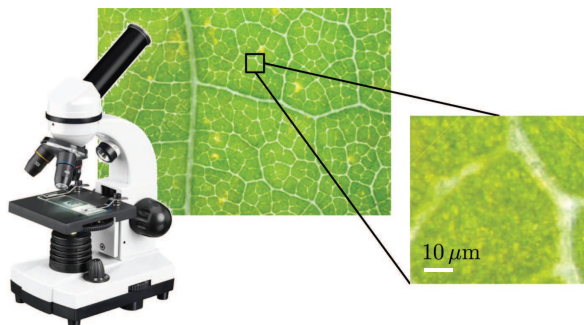


FIG. 1.1 – Image d’une feuille formée avec un microscope optique usuel. En augmentant le grandissement au voisinage d’une nervure, les structures formées par les cellules apparaissent floues. La résolution est de l’ordre du micromètre dans ce cas précis.

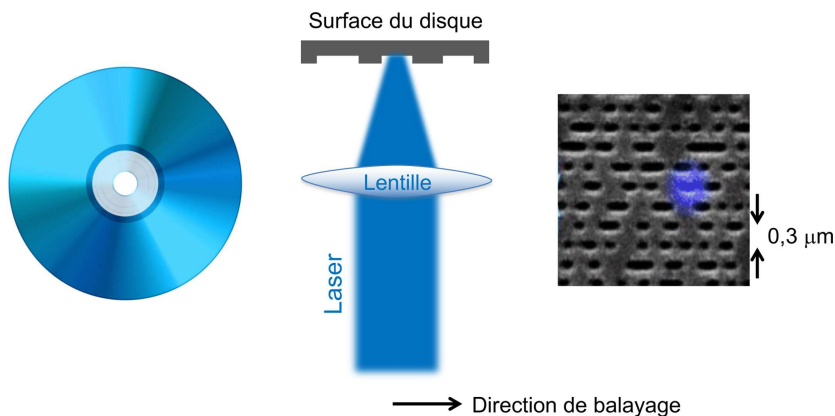


FIG. 1.2 – Principe de fonctionnement d’un lecteur DVD blu-ray. Un laser de longueur d’onde courte (bleue) est focalisé sur la surface gravée du DVD. La taille du spot laser, visible sur l’image de droite, limite la densité de trous sur la surface qui codent les 0 et les 1 du signal numérisé et donc la capacité de stockage du DVD. En effet, le spot laser ne doit éclairer qu’un seul trou à la fois.

détecteur dépend alors de la position du spot laser, sur ou hors des trous, ce qui code une succession de 0 ou de 1. Le signal numérisé est ensuite transformé en image et en son.

La plupart des avancées technologiques dans ce domaine a visé à augmenter la quantité d’information disponible sur le disque, et donc à augmenter le nombre de trous en diminuant leur taille et leur espacement. C’est ainsi que l’on est passé du CD au DVD puis au blu-ray. Cependant, la taille du spot laser impose une distance minimale entre les trous. En effet, pour garder un signal bien défini qui distingue clairement les 0 des 1, la différence entre l’intensité mesurée hors et sur les trous doit être bien marquée. Pour cela, la taille du spot

doit être plus petite que l'espacement entre les trous (voir figure 1.2). Diminuer la taille du spot, c'est-à-dire focaliser la lumière dans le plus petit volume possible a été un objectif majeur du domaine pendant des dizaines d'années. Cependant, comme pour le microscope, apparaît une limite fondamentale qu'aucune amélioration technologique ne peut surpasser. La taille du spot de focalisation ne peut pas être réduite à zéro. Elle est contrainte par la longueur d'onde de la lumière (qui définit sa couleur) et ne peut descendre en-dessous de la demi longueur d'onde. C'est la raison pour laquelle les lecteurs blu-ray utilisant une lumière bleue (longueur d'onde de 480 nm) sont plus performants que les premiers lecteurs CD utilisant une lumière infrarouge (longueur d'onde 800 nm). Cette incapacité à focaliser la lumière en dessous de la demi longueur d'onde est appelée *limite de diffraction*. C'est elle qui limite fondamentalement la résolution des microscopes et la capacité de stockage des DVD.

Il est étonnant de rapprocher ainsi microscopes et lecteurs DVD, ou plus généralement l'imagerie plein champ, qui utilise la lumière d'une lampe pour éclairer l'échantillon sur toute sa surface, et l'imagerie à balayage, dans laquelle l'échantillon est parcouru par un spot lumineux. Nous allons voir qu'il y a une équivalence parfaite entre ces deux techniques d'imagerie.

1.1.2 Microscopie plein champ et à balayage

La discussion précédente illustre les deux approches utilisées en microscopie optique : la technique dite « plein champ » et la technique dite « à balayage ». Dans la technique plein champ, qui est celle qui a été développée initialement (dès le XVII^e siècle), l'échantillon est éclairé de manière uniforme et l'intensité réfléchie ou transmise par l'échantillon est collectée par un système optique et enregistrée par une matrice de détecteurs ponctuels (ensemble des photorécepteurs de la rétine, ou pixels d'une caméra par exemple). Le système optique de collection assure une correspondance (conjugaison) entre chaque point de l'objet et chaque détecteur ponctuel. L'ensemble des détecteurs forme donc une image de l'objet. Dans la technique à balayage, l'échantillon est éclairé localement par un faisceau lumineux focalisé, et toute la lumière réfléchie ou transmise est collectée sur un détecteur étendu unique. L'image est alors obtenue en déplaçant l'objet ou le faisceau incident, d'où le terme « balayage ».

En illumination plein champ, la source lumineuse est souvent une simple lampe. Elle est constituée d'une multitude de sources élémentaires, indépendantes les unes des autres, dont les intensités émises s'ajoutent lors de la détection. Cette source étendue permet d'éclairer de manière uniforme l'échantillon. En microscopie à balayage, la lumière incidente est concentrée (focalisée) sur une toute petite surface de l'échantillon. Pour cela, la lumière doit provenir d'une source ponctuelle unique formant une onde sphérique divergente, qui est transformée par le système optique d'éclairement en onde sphérique convergente se concentrant sur l'objet (focalisation). Historiquement, on utilisait la lumière d'une lampe filtrée spatialement par un trou d'épingle dans un écran

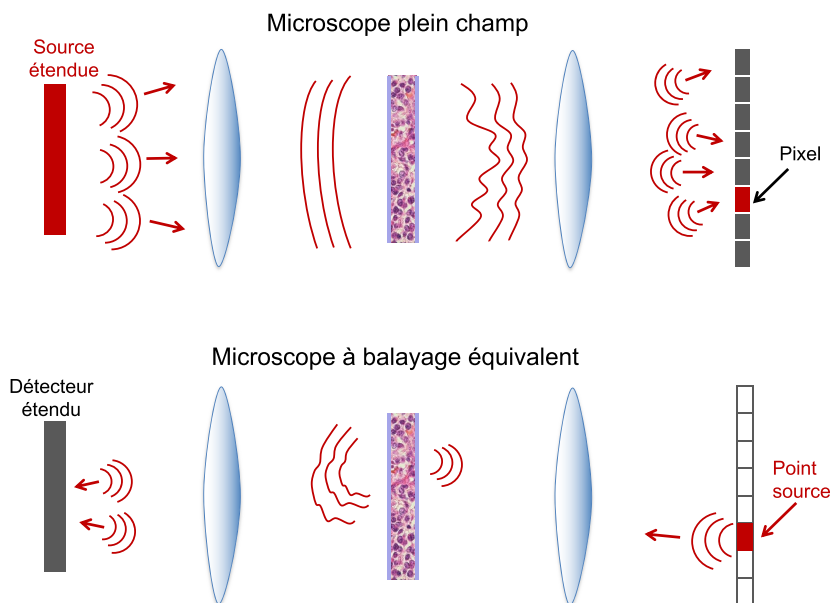


FIG. 1.3 – Schéma de principe d'un microscope plein champ et d'un microscope à balayage. Dans le système plein champ, la source est étendue et le détecteur est un ensemble de détecteurs ponctuels, ou pixels. Dans le système à balayage, la source est ponctuelle et crée un spot focalisé qui est déplacé (balayé) sur l'objet pour former une image en collectant pour chaque position du spot toute la lumière transmise sur un détecteur étendu. Les deux lentilles dans chaque montage représentent les optiques d'éclairage et de collection, qui en pratique sont plus complexes qu'une simple lentille. Les deux configurations représentées sont rigoureusement équivalentes, ou réciproques.

noir. Aujourd'hui, on utilise un laser dont le faisceau initial peut être focalisé directement par le système optique, ce qui est équivalent à utiliser une source ponctuelle mais sans filtrage par un trou d'épingle (on réduit ainsi la perte de puissance lumineuse). Le microscope à balayage implique donc un éclairage localisé et une détection globale tandis que le microscope plein champ repose sur un éclairage uniforme et une détection localisée. Les deux techniques sont représentées schématiquement sur la figure 1.3.

1.1.3 Réciprocité

Les deux techniques que nous venons de décrire peuvent sembler radicalement différentes. Pourtant elles fournissent des images de même nature. En effet, la lumière, comme toutes les ondes, satisfait au théorème de réciprocité que l'on pourrait résumer par la phrase « si je te vois, alors tu me vois ». Plus

précisément, si une source de lumière placée au point A génère une certaine intensité lumineuse au point B, alors une source identique placée au point B génère la même intensité au point A.

En appliquant ce théorème de réciprocité, on conclut que l'intensité mesurée sur un pixel de la caméra d'un microscope plein champ est identique à l'intensité globale mesurée par un microscope à balayage qui utiliserait une source ponctuelle placée à la position du pixel, et un détecteur étendu couvrant exactement la surface de la source de lumière du microscope plein champ. Ce principe d'équivalence permet d'unifier l'analyse de la microscopie plein champ et à balayage. Sur la figure 1.3, les microscopes plein champ et à balayage qui sont représentés correspondent à deux configurations équivalentes. Nous étudierons dans la suite la configuration à balayage, dont le fonctionnement est plus intuitif, et nous garderons en tête que tous les résultats s'appliquent aux deux types de microscopie.

1.2 Le microscope à balayage

Dans cette partie, nous analysons les propriétés d'un microscope à balayage fonctionnant en transmission. Ce dernier produit des images qui sont identiques, par réciprocité, à celles fournies par le microscope classique que nous avons rencontré au cours de notre scolarité pour étudier des échantillons biologiques ou géologiques translucides.

Pour simplifier l'étude, nous supposons que l'objet à observer est une diapositive (c'est-à-dire un objet mince formé de zones plus ou moins absorbantes) dont chaque point M est décrit par une transmittance $T(M)$.¹ Le faisceau incident se propage perpendiculairement à la diapositive (le long de la direction appelée axe optique) et est focalisé dans le plan contenant la diapositive. Toute l'intensité transmise est collectée par un détecteur étendu placé en aval de l'objet. Un montage de microscope à balayage en transmission est représentée sur la figure 1.4.

1.2.1 Formation de l'image

Si le faisceau lumineux focalisé au point M est assimilable à un rayon infiniment fin d'intensité I , l'intensité lumineuse transmise collectée par le détecteur sera $I \times T(M)$. L'image obtenue en déplaçant le faisceau en tout point de la diapositive permet alors de reconstruire directement la carte de transmittance.

En pratique, comme nous l'avons vu sur l'exemple du DVD, le point de focalisation a une taille finie du fait de la diffraction, et l'image est plus difficile à interpréter. Le faisceau forme une tache de lumière dans le plan

1. La transmittance au point M mesure la capacité d'un petit élément de surface centré en M à transmettre la lumière. Elle est définie comme l'intensité transmise par l'élément de surface divisée par l'intensité incidente sur l'élément de surface lorsque la taille de l'élément devient infiniment petite. Elle dépend essentiellement de l'absorption locale de la diapositive (présence ou non de colorant par exemple) au point M .

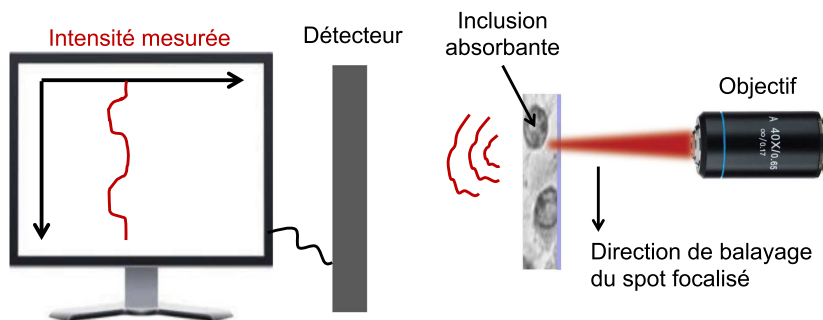


FIG. 1.4 – Schéma de principe d'un microscope à balayage. Le faisceau laser focalisé sur l'objet est déplacé parallèlement à celui-ci. Lorsque le faisceau coïncide avec une zone absorbante, la transmittance est réduite et l'intensité mesurée par le détecteur diminue.

de la diapositive. Dans la plupart des cas, le maximum d'intensité I_{max} est obtenu au point de focalisation M , au centre de la tache, et l'intensité lumineuse décroît lorsqu'on s'éloigne de M . Formellement, l'intensité lumineuse incidente en un point A quelconque de la tache dépendra de la distance MA et s'écrira $I(MA)$.

Considérons dans un premier temps une diapositive correspondant à un écran opaque percé d'un petit trou au point A . La transmittance de cet objet est donc 0 partout excepté en A où elle vaut 1. Lorsque la tache de focalisation du faisceau incident est centrée en M , l'intensité transmise est alors $I(MA)$. En déplaçant la position du point de focalisation M sur toute la diapositive, on construit une image $D(M)$ (intensité reçue par le détecteur) telle que $D(M) = I(MA)$. On constate alors que l'image obtenue ne correspond pas à la transmittance de la diapositive, mais reproduit la tache formée par l'intensité incidente, centrée en A . En d'autres termes, l'image du trou ponctuel qui a été formée est une tache : on a une image floue.

Considérons maintenant une diapositive plus complexe décrite par sa transmittance $T(N)$ où N est un point quelconque du plan de la diapositive. L'intensité totale transmise mesurée par le détecteur lorsque le point de focalisation du faisceau est M sera la somme de la transmittance multipliée par l'intensité incidente en tout point N de la diapositive, $D(M) = \sum_N T(N)I(MN)$. Cette expression représente le modèle de formation de l'image en microscopie à balayage (et par réciprocité en microscopie plein champ). Elle montre que le signal détecté $D(M)$ (qui forme l'image lorsque la position M du point de focalisation varie) ne dépend pas uniquement de la transmittance de la diapositive au point M mais représente une moyenne pondérée de la transmittance sur un domaine dont l'extension correspond à la tache d'illumination. C'est la taille de cette tache qui limite ainsi la capacité du microscope à mesurer la différence de transmittance entre deux points de l'objet très proches l'un de l'autre.

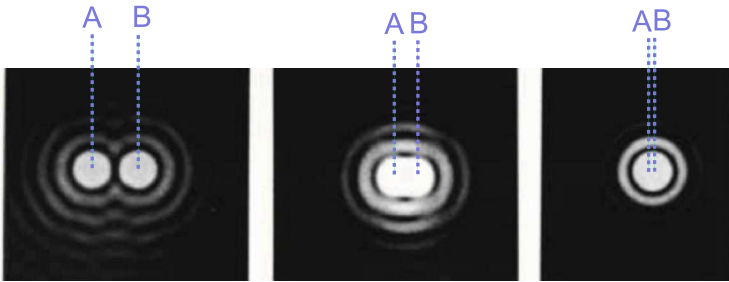


FIG. 1.5 – Taches de lumière produites en imageant deux trous A et B dans un écran opaque. Lorsque la distance séparant les deux trous diminue, les taches se recouvrent. En deca d'une distance critique, les deux taches ne peuvent plus être distinguées. Cette distance critique définit la limite de résolution du microscope.

1.2.2 La résolution

La résolution spatiale d'un microscope est définie comme la distance minimale entre deux objets ponctuels qui permet de les distinguer dans l'image. Considérons de nouveau une diapositive très simple, constituée d'un écran opaque percé de deux trous en A et B . L'image obtenue lors du balayage du faisceau incident est décrite par $D(M) = I(MA) + I(MB)$. Introduisons O le milieu de $[AB]$, tel que $OA = OB$. On peut dire que les deux points A et B peuvent être distingués dans l'image si $D(O) < D(A)$ (et également $D(O) < D(B)$ puisque $D(A) = D(B)$ si les deux trous sont identiques). Or on a $D(O) = I(OA) + I(OB) = 2I(OA)$ et $D(A) = I(AA) + I(AB) = I_{max} + I(AB)$. Ici, nous avons utilisé le fait que $I(AA) = I_{max}$, puisque $I(AA)$ est l'intensité détectée lorsque le point de focalisation coïncide avec la position du trou (ici le trou A) lorsque le point de focalisation d'intensité I_{max} coïncide avec la position du trou. Le critère $D(O) < D(A)$ est toujours vérifié lorsque la distance AB est telle que $I(OA) < I_{max}/2$. Avec cette définition, la limite de résolution est donc la largeur à mi-hauteur de la tache de lumière formée par le faisceau incident sur l'objet.² La limite de résolution est illustrée sur la figure 1.5.

Il est nécessaire à présent d'entrer dans les détails du système optique pour estimer la largeur de cette tache de lumière. Il faut pour cela comprendre comment l'on produit un faisceau de lumière focalisé à partir de la lumière rayonnée par la source ponctuelle (ou le faisceau laser) du microscope à balayage. L'élément clé du microscope est son objectif qui peut être assimilé en première approche à une lentille convergente sophistiquée. Ce composant optique permet de transformer des rayons lumineux parallèles en rayons convergents. Nous avons tous utilisé une lentille (ou loupe) et pu constater sa capacité à

2. Deux trous ponctuels A et B séparés par la largeur à mi-hauteur de la tache de lumière ne sont pas toujours distinguables sur l'image. La condition $I(OA) < I_{max}/2$ n'a de sens que pour des signaux non bruités. En pratique, I_{max} et $I(OA)$ fluctuent avec le bruit de mesure et la résolution dépendra alors aussi de l'amplitude de ces fluctuations.

Sciences with Innovative Technologies. Le DIM Elicit favorise la collaboration entre biologistes et technologues, ainsi que les partenariats avec des industriels. Son objectif est de donner de la puissance à la recherche en biologie grâce aux innovations technologiques. Il est coordonné par Elodie Brient-Litzler et Jean-Christophe Olivo-Marin de l'Institut Pasteur, et Jean Baudry de L'École supérieure de physique et de chimie industrielles.

À travers des appels à projets annuels, le DIM Elicit finance des équipes de recherche francilienne pour concevoir des technologies de rupture ou les disséminer pour de premières applications en biologie. Ces technologies couvrent des thématiques comme la microfluidique, la biophotonique et les ondes, et l'analyse d'images. Certains projets développent des applications dans l'analyse de la cellule unique par microscopie à haute résolution, l'analyse d'images ou encore l'intelligence artificielle pour générer de nouvelles thérapies fondées sur l'étude de populations hétérogènes comme, par exemple, un sous-ensemble de cellules résistantes à la chimiothérapie dans une tumeur.



Q-Life

PSL-Qlife, Institut de Convergences dédié à la biologie quantitative a été créé en 2017 dans le cadre du “Programme d’investissements d’avenir” lancé par le gouvernement français. Il rassemble des biologistes, des chimistes, des physiiciens, des bioinformaticiens et des mathématiciens afin de comprendre des procédés biologiques avec une approche quantitative, spatio-temporelle et ce, de manière prédictive. Ce projet compte 160 équipes implantées dans 8 différents instituts membres de PSL, et propose également un programme d’enseignement pour la biologie interdisciplinaire. PSL-Qlife a pour ambition d’être un leader mondial en termes d’enseignement, de recherche et d’innovation dans le domaine de la biologie quantitative.

IMAGER L'INVISIBLE AVEC LA LUMIÈRE

COMMENT L'OPTIQUE MODERNE RÉVOLUTIONNE
L'IMAGERIE DU VIVANT

SYLVAIN GIGAN ET CATHIE VENTALON, COORD.

Notre œil est un outil exceptionnel qui reste néanmoins limité en résolution et en sensibilité. Même avec les appareils traditionnels de l'optique, comme les microscopes, il n'est pas possible de pénétrer les environnements complexes. Les nouveaux instruments de la physique, en particulier les lasers, ont permis des avancées qui étaient jusqu'à récemment du domaine de la science-fiction : voir en profondeur dans un tissu biologique, discerner une molécule unique, visualiser le fonctionnement interne d'une cellule ou encore voir un neurone en action. Quelles techniques, quels outils ont permis ces avancées ?

Le livre décrit tour à tour le microscope, l'optique adaptative, l'imagerie en milieu diffusant, l'holographie et la microscopie de fluorescence. Il présente de manière accessible les concepts physiques en jeu et montre que nous avons aujourd'hui des outils permettant de répondre à des questions fascinantes : comment fonctionne notre cerveau, neurone par neurone ? Peut-on détecter précocement un cancer ou des maladies de la rétine ?

Cathie Ventalon est chercheuse CNRS à l'institut de biologie de l'École normale supérieure. Elle développe de nouvelles méthodes optiques pour les neurosciences, dans le but d'étudier le lien entre l'activité neuronale et les comportements, la mémoire ou la perception sensorielle.

Sylvain Gigan est professeur à Sorbonne Université et chercheur au Département de Physique de l'École normale supérieure. Il travaille sur la propagation de la lumière, en particulier pour l'imagerie, dans les milieux complexes et biologiques.

Série Physique dirigée par Michèle LEDUC et Michel LE BELLAC

SAVOIRS ACTUELS

Collection dirigée par Michèle LEDUC

CNRS EDITIONS

www.cnrseditions.fr

edp sciences
www.edpsciences.org

Création graphique : Béatrice Couëdel



9 782759 826544

22 €

ISBN EDP Sciences 978-2-7598-2654-4
ISBN CNRS ÉDITIONS 978-2-271-14479-9

Ces ouvrages, écrits par des chercheurs, reflètent des enseignements dispensés dans le cadre de la formation à la recherche. Ils s'adressent donc aux étudiants avancés, aux chercheurs désireux de perfectionner leurs connaissances ainsi qu'à tout lecteur passionné par la science contemporaine.