



## THÈSE

Pour obtenir le grade de  
**Docteur d'Aix Marseille Université**

Mention

**Optique, Photonique & Traitement d'Image**

École doctorale Physique et Sciences de la Matière

---

# **Analyse Quantitative d'images de Phase obtenues par Interférométrie à Décalage Quadri-Latéral. Applications en Biologie.**

---

Présentée par

**Sherazade AKNOUN**

Soutenue publiquement le 4 décembre 2014

devant le jury composé de :

M. Hugues	GIOVANNINI	Examineur
M. Serge	MONNERET	Directeur de thèse
M. Matthieu	PIEL	Rapporteur
M. Angelo	PIERANGELO	Examineur
M. Philippe	POGNONEC	Examineur
M. Benoit	WATTELLIER	Co-Directeur de thèse
Mme. Nathalie	WESTBROOK	Rapporteur



# Analyse Quantitative d'images de Phase obtenues par Interférométrie à Décalage Quadri-Latéral. Applications en Biologie.

---

Ces travaux de thèse, consacrés à l'étude et analyse quantitative d'images de phase obtenues par interférométrie à décalage quadri-latéral, ont pour but la caractérisation d'un point de vue métrologique d'un outil de mesure et de ses différentes applications.

Cette thèse CIFRE, résultat d'une collaboration et d'une co-direction de l'Institut Fresnel et de l'entreprise Phasics, s'inscrit dans la continuité de celle de Pierre Bon qui avait pour objet l'application d'une nouvelle technique utilisée auparavant en métrologie optique à la microscopie.

Cette technique d'interférométrie, développée initialement par la société Phasics pour les marchés de la métrologie optique et de la caractérisation de faisceaux laser essentiellement, peut aussi permettre d'obtenir la cartographie d'un champ électromagnétique complexe grâce à une mesure de front d'onde. En l'utilisant sur un microscope en condition d'imagerie, ont été obtenues des images de l'intensité et de la différence de chemin optique introduite par un échantillon semi-transparent, définissant ainsi une nouvelle technique de contraste de phase quantitatif.

La première partie de cette thèse sera consacrée aux techniques en microscopie qui permettent une quantification. Nous verrons les enjeux de l'obtention de ce caractère quantitatif et ce qu'il signifie dans le cadre de différentes techniques utilisant la fluorescence. Une description plus exhaustive des différentes techniques de phase quantitative sera réalisée afin de pouvoir re-situer et comparer la technique utilisée dans ces travaux de thèse dans le cadre de l'imagerie de phase.

On étudiera la mesure dans le cadre d'une approximation dite "projective" réalisant certaines hypothèses. On verra quelles sont les grandeurs accessibles grâce à une mesure dans le cadre de cette approximation et quelles applications en biologie peuvent être développées concernant les éléments isotropes dans une première partie et les éléments anisotropes dans une seconde partie.

Nous démontrerons la possible transposition de ces applications réalisées en deux dimensions en trois dimensions après avoir expliqué la mesure réalisée dans une configuration permettant une imagerie avec une résolution axiale suffisante permettant une reconstruction tomographique.



# Quantitative phase images analysis obtained by quadri-wave lateral shearing interferometry. Applications to Biology.

---

The aim of this thesis, dedicated to the study and quantitative analysis of phase images obtained thanks to quadri-wave lateral shearing interferometry, is to characterize a metrological tool and its three proposed different applications.

This work has been done in collaboration between Institut Fresnel (Marseille, France) and Phasics company (Palaiseau, France) and continues that of Pierre Bon who has been in charge the application this technique to microscopy.

This interferometric technique, developed by Phasics, for optical metrology and lasers characterization, allows to record complex electromagnetic field maps thanks to a wave front measurement. By using it in the microscope image plane, one can obtain intensity and optical path difference images of a semi-transparent biological sample. this technique is now considered as a new quantitative phase contrast technique.

The first part of this manuscript will be a state of the art of quantitative microscopy techniques. The issues of quantification and its meanings in the framework of different fluorescent and phase based techniques will be discussed. A description of the technique that is used and its comparison with similar phase techniques will be done.

The measurement, under the projective approximation, is studied leading to different variables. We show different applications concerning isotropic elements in a first part and anisotropic elements in the second one.

We show how this measurement is transposed to the third dimensions allowing three dimensional imaging and complete reconstruction of refractive index maps of biological samples.



"La réussite n'est que le fruit d'une succession d'échecs"



Avec ce manuscrit, se soldent trois années passionnantes et enrichissantes que j'ai passées au sein de l'entreprise Phasics et de l'Institut Fresnel. Il est d'usage de clôturer ces trois années de thèse par des remerciements. Je choisis de commencer la longue liste par un merci tout particulier à mes directeurs de thèse Benoit Wattellier et Serge Monneret pour m'avoir accordé leur confiance et donné la chance de faire ma thèse sous leur supervision. C'était une superbe expérience qui m'a fait me dépasser et grandir. Merci pour le soutien constant, l'écoute et l'indépendance qui m'ont été donnés.

Je remercie également chaleureusement Nathalie Westbrook et Matthieu Piel pour avoir accepté d'être rapporteurs de ma thèse ainsi que Angelo Pierangelo, Philippe Pognonec et Hugues Giovannini pour avoir accepté d'être examinateurs.

Je continue la liste avec un merci général à toutes les personnes que j'ai côtoyé à Phasics et à Fresnel durant ces trois années, pour l'accueil chaleureux et le cadre privilégié qui m'a permis d'évoluer au quotidien dans un univers où il faisait bon travailler. Merci à tous les phasiciens et fresneliens pour la bonne humeur qui règne dans les bureaux et autour de la machine à café.

Plus particulièrement, je voudrais remercier Aurélie et Lucie pour les très bons moments passés ensemble qu'ils soient sportifs ou non, les afterworks, les midis "tup". Merci à vous les filles!

J'aimerais remercier Mr Bon pour m'avoir conseillée et guidée depuis mes débuts de stagiaire. Merci pour ta bonne humeur et ta grande disponibilité pour répondre à mes questions type "le SID4 pour les nuls". Malheureusement pour toi, il faudra encore supporter ça quelques temps!

Du côté "Fresnel", j'aimerais remercier Julien Savatier pour sa disponibilité et sa constante bonne humeur. Merci aussi pour la patience dont il fait preuve face à nos élucubrations de physiciens!

Enfin, je tiens à remercier tous ceux qui ont fait ce petit bout de chemin à mes côtés, j'ai beaucoup de chance de vous avoir (même si je ne le dis pas assez, je sais...). Merci pour le soutien, le coaching sous toutes ses formes, les soirées "loose", les cheesecakes, les pâtes améliorées et autres sources de réconfort quand le moral n'y était pas. Ceci n'aurait pas pu être fait sans vous! Pour les marseillais, j'espère que nos routes se recroiseront un jour!

Je conclus cette session de remerciements par ces quelques mots à mes parents, soutiens indéfectibles, présents, attentifs et dotés d'une patience infinie. C'est vous qui avez eu la plus lourde tâche je crois et vous êtes maintenant devenus des spécialistes en remotivation/remise en forme/détente de thésard. Merci d'être vous.



---

## Table des matières

---

<b>Introduction</b>	<b>1</b>
<b>1 Techniques en microscopie quantitatives en biologie</b>	<b>5</b>
1.1 Techniques quantitatives utilisant la fluorescence . . . . .	5
1.1.1 Le phénomène de fluorescence . . . . .	6
1.1.2 La fluorescence comme outil de localisation . . . . .	7
1.1.3 La fluorescence comme outil de mesure de dynamique moléculaire . . . . .	8
1.1.4 La fluorescence comme outil de mesure de l'orientation moléculaire . . . . .	10
1.1.5 Conclusion . . . . .	10
1.2 Techniques dédiées au contraste de phase quantitatif . . . . .	11
1.2.1 La microscopie holographique . . . . .	12
1.2.1.1 La microscopie holographique <i>hors axe</i> ou <i>double path</i> . . . . .	13
1.2.1.2 La microscopie holographique <i>sur l'axe</i> ou <i>common path</i> . . . . .	15
1.2.2 Microscopie de phase par diffraction sur un réseau . . . . .	15
1.2.3 Microscopie à décalage de phase . . . . .	17
1.2.4 Imagerie de phase quantitative par interférométrie à décalage quadri- latéral . . . . .	19
1.2.4.1 Introduction à la technique . . . . .	19
1.2.4.2 Création des différentes répliques . . . . .	19
1.2.4.3 Formation d'un interférogramme . . . . .	22
1.2.4.4 Obtention des gradients de la phase . . . . .	24
1.2.4.4.1 Démodulation . . . . .	24
1.2.4.4.2 Échantillonnage de l'information sur le détecteur . . . . .	27
1.2.4.5 Prise de référence . . . . .	30
1.2.4.6 Montage expérimental . . . . .	32
1.2.5 Conclusion . . . . .	32

<b>2</b>	<b>Mesure et quantification d'échantillons fins</b>	<b>35</b>
2.1	Contexte . . . . .	35
2.2	Mesure d'une différence de chemin optique en mode projectif . . . . .	36
2.2.1	Principe de l'approche et hypothèses réalisées . . . . .	36
2.2.2	Caractérisation de la mesure . . . . .	37
2.2.2.1	Démarche métrologique . . . . .	38
2.2.2.2	Limite de quantification-Résolution de la mesure . . . . .	38
2.2.2.3	Performances de la mesure . . . . .	41
2.2.2.4	Influence de paramètres expérimentaux . . . . .	43
2.2.3	Conclusion sur la caractérisation de la mesure d'OPD . . . . .	45
2.3	Mesure d'indice de réfraction sur échantillon calibré . . . . .	46
2.4	Application de la mesure projective en biologie : mesure de masse sèche . .	49
2.4.1	Principe de la mesure . . . . .	50
2.4.2	Valeurs du coefficient $\alpha$ , incrément spécifique d'indice de réfraction	52
2.4.3	Réalisation expérimentale . . . . .	53
2.4.4	Caractérisation de la mesure . . . . .	53
2.4.4.1	Erreur de segmentation . . . . .	54
2.4.4.2	Répétabilité de la segmentation . . . . .	55
2.4.4.3	Influence du grandissement sur la segmentation . . . . .	56
2.4.4.4	Influence de la mise au point sur la segmentation . . . . .	57
2.4.4.5	Influence de la cohérence spatiale sur la segmentation . . .	59
2.4.5	Application à la mesure de masse sèche de globules rouges . . . . .	60
2.4.6	Conclusion sur la partie caractérisation de la mesure de masse sèche	63
2.5	Exemples de mesure de masse sèche en biologie . . . . .	63
2.5.1	Tests statistiques et représentations des données . . . . .	64
2.5.1.1	Réalisation d'un test statistique . . . . .	64
2.5.1.2	Représentations des données . . . . .	65
2.5.2	Étude quantitative de masse sèche de levures . . . . .	66
2.5.2.1	Cycle cellulaire . . . . .	66
2.5.2.2	But des études réalisées . . . . .	67
2.5.2.3	Croissance des cellules et milieux de culture . . . . .	68
2.5.2.4	1ère étude : mise en évidence de différences de croissance entre populations en conditions de croissance exponentielle et état stationnaire . . . . .	68
2.5.2.4.1	Croissance de <i>S. cerevisiae</i> . . . . .	68
2.5.2.4.2	Résultats . . . . .	70
2.5.2.4.3	Comparaison des populations diploïdes et haploïdes de levures <i>S. cerevisiae</i> . . . . .	75
2.5.2.5	Étude de populations de <i>S. pombe</i> . . . . .	77
2.5.3	La mesure de masse sèche comme outil de classification d'une popu- lation cellulaire . . . . .	81
2.5.3.1	Résultats de la classification utilisée sur une population de levures <i>S. cerevisiae</i> diploïdes en croissance exponentielle .	82

2.5.3.1.1	Utilisation de paramètres supplémentaires . . . . .	85
2.5.4	Suivi temporel de la masse sèche de levures . . . . .	88
2.5.4.1	Suivi temporel de levures <i>S. cerevisiae</i> . . . . .	88
2.5.4.2	Suivi temporel de levures <i>S.pombe</i> . . . . .	90
2.5.4.3	Conclusions . . . . .	91
2.5.5	Optimisation de l'échantillonnage temporel dans le cadre de l'évolution de masse sèche d'une population . . . . .	92
2.5.5.1	Relation entre précision de la mesure et échantillonnage temporel : modèle statistique . . . . .	92
2.5.5.2	Analyse des données . . . . .	94
2.5.6	Étude quantitative de l'influence du marquage fluorescent sur la quantité de masse sèche de cellules . . . . .	94
2.5.6.1	Marquage de l'actine par transfection, étude d'une lignée stable de cellules de type HT1080 . . . . .	95
2.5.6.1.1	Synthèse des résultats . . . . .	96
2.5.6.2	Marquage de l'ADN de cellules COS-7 avec la sonde sonde Hoechst 33342 . . . . .	98
2.5.6.2.1	Conclusion de l'étude de l'influence d'un marquage fluorescent sur la masse sèche de cellules . . . . .	100
2.6	Conclusion sur le modèle projectif . . . . .	100
<b>3</b>	<b>L'anisotropie comme nouvelle source de contraste quantitatif</b>	<b>103</b>
3.1	Contexte . . . . .	103
3.2	Introduction . . . . .	103
3.2.1	Notions de polarimétrie . . . . .	103
3.2.2	Les éléments biréfringents en biologie cellulaire et tissulaire . . . . .	108
3.2.3	Exemples de techniques de polarimétrie microscopique . . . . .	109
3.3	Mesure de biréfringence par analyse de front d'onde . . . . .	111
3.3.1	Mesure d'un front d'onde en lumière polarisée . . . . .	111
3.3.2	Mesure de biréfringence . . . . .	116
3.3.2.1	Établissement de l'expression du champ électrique en sortie d'un élément biréfringent . . . . .	116
3.3.2.2	Intensité relative des deux composantes de polarisation . . . . .	118
3.3.2.3	Phase de l'onde selon $\vec{u}^{\parallel}$ . . . . .	120
3.3.2.4	Domaine de validité pour lequel la composante orthogonale est négligeable. Ordre de grandeur . . . . .	121
3.3.2.5	Domaine de validité pour lequel la composante orthogonale est négligeable. Confirmation par des simulations . . . . .	123
3.3.3	Détermination expérimentale de $\Delta\delta$ , $\frac{(\delta o + \delta e)}{2}$ et $\theta_0$ . . . . .	127
3.3.3.1	Calcul des coefficients de biréfringence . . . . .	127
3.3.3.2	Choix de la répartition des angles d'excitation . . . . .	128
3.3.3.3	Visualisation des paramètres de biréfringence . . . . .	129
3.4	Validation expérimentale . . . . .	130

3.4.1	Montage expérimental . . . . .	130
3.4.2	Erreurs commises sur la mesure de retard . . . . .	131
3.4.2.1	Moyenne d'acquisitions . . . . .	131
3.4.2.2	Prise de référence . . . . .	131
3.4.2.3	Erreur sur la polarisation incidente . . . . .	133
3.4.2.4	Erreur due au mouvement de l'échantillon . . . . .	133
3.5	Résultats . . . . .	134
3.5.1	Échantillons de référence . . . . .	134
3.5.1.1	Cas d'un échantillon isotrope (blanc métrologique) . . . . .	134
3.5.1.2	Étude de cristaux . . . . .	135
3.5.1.3	Étude de fibres de collagène . . . . .	138
3.5.2	Étude d'une bicouche lipidique . . . . .	140
3.5.3	Mesure de retard d'échantillons de cellules vivantes . . . . .	145
3.5.3.1	Cellules COS-7 . . . . .	145
3.5.3.2	Mesures avec une configuration multimodale OPD/fluorescence	147
3.6	Conclusion . . . . .	149
3.7	Perspectives : mesure de biréfringence rapide . . . . .	150
<b>4</b>	<b>Reconstruction tridimensionnelle d'échantillons biologiques</b>	<b>151</b>
4.1	Introduction . . . . .	151
4.1.1	Contexte . . . . .	151
4.1.2	Techniques d'imagerie 3D . . . . .	153
4.1.2.1	Imagerie qualitative . . . . .	153
4.1.2.2	Imagerie quantitative . . . . .	155
4.1.2.3	La cohérence spatiale en microscopie . . . . .	156
4.2	Modélisation des images de phase en illumination incohérente . . . . .	158
4.2.1	Approche fréquentielle de la formation des images . . . . .	158
4.2.1.1	Réponse fréquentielle d'un microscope . . . . .	160
4.2.2	La tomographie diffractive . . . . .	163
4.2.2.1	Principe de la méthode de tomographie diffractive . . . . .	163
4.2.2.2	Etablissement de l'expression du champ diffracté en tomographie diffractive . . . . .	164
4.2.2.3	Adaptation des outils de tomographie diffractive . . . . .	165
4.2.3	Formation des images de phase quantitative par ID4L dans des conditions d'illumination incohérente . . . . .	166
4.2.3.1	Équation des interférogrammes obtenus . . . . .	166
4.2.3.2	Influence du grandissement sur le contraste de l'interférogramme mesuré . . . . .	168
4.2.4	Influence de la cohérence spatiale de l'illumination sur la mesure de l'OPD . . . . .	170
4.2.5	Réponse fréquentielle de l'imagerie de phase incohérente . . . . .	171
4.2.5.1	Utilisation de la Fonction de Transfert de Modulation du système . . . . .	171

4.2.6	Images d'objets bidimensionnels . . . . .	172
4.2.7	Images d'objets tridimensionnels . . . . .	173
4.2.7.1	Déconvolution d'images . . . . .	174
4.3	Résultats expérimentaux . . . . .	176
4.3.1	Montage expérimental et protocole . . . . .	176
4.3.1.1	Application de la mesure à l'imagerie d'échantillons calibrés	178
4.3.2	Application de la mesure à l'imagerie de tissus et d'objets d'épaisseur inférieure à 15 microns (monocouche) . . . . .	180
4.3.2.1	Reconstruction tomographique d'une cellule épithéliale . .	180
4.3.2.2	Reconstruction tomographique d'un tissu de 14 $\mu$ m d'épaisseur . . . . .	183
4.3.3	Application de la mesure à l'imagerie de tissus épais . . . . .	184
4.4	Conclusions . . . . .	189
4.5	Perspectives . . . . .	190
4.5.1	Correction des images grâce à l'utilisation d'optique adaptative . .	190
4.5.2	Passage des techniques bidimensionnelles à l'imagerie tridimensionnelle	194
	<b>Conclusion</b>	<b>195</b>
	<b>A Description de l'algorithme de segmentation d'images</b>	<b>199</b>
A.1	Détection des cellules par rapport au fond et aplanissement du fond . . . .	199
A.2	Séparation des différentes cellules de l'image . . . . .	201
	<b>B Etude complémentaire de la levure S.cerevisiae sous sa forme haploïde</b>	<b>203</b>
	<b>C Enhanced 3D spatial resolution in quantitative phase microscopy using spatially incoherent illumination</b>	<b>208</b>



---

## Introduction

---

La microscopie connaît ses débuts au cours du XVI<sup>e</sup> siècle avec la création du premier microscope par Hans Janssen en 1590. Cette création fait suite à la volonté d'agrandir des objets trop petits pour être visualisés à l'œil nu.

Actuellement, les deux axes principaux de développements de la microscopie sont :

- la super résolution, et ce dans le but d'imager des structures toujours plus petites, des détails toujours plus fins. On cherche à accroître ainsi la résolution du système d'imagerie, c'est-à-dire sa capacité à séparer deux points, en allant au delà de la limite de diffraction,
- le quantitatif, afin d'accumuler un grand nombre de données indispensables pour tenir compte de la variabilité des échantillons biologiques. On veut désormais extraire des informations quantitatives des échantillons ou des images étudiés.

La quantification, l'imagerie et le contraste seront les thèmes centraux de ce manuscrit. En effet, l'enjeu majeur de l'imagerie d'échantillons biologiques est la création de contraste pour pouvoir visualiser afin d'identifier et de quantifier. Ceci, dans le but de comprendre le fonctionnement de processus au sein des cellules ou des tissus ou encore de caractériser des éléments au sein d'échantillons complexes.

Le contraste donne une indication sur la dynamique de l'image, plus il est élevé et plus on pourra discerner les différents détails de l'objet. Il est donc crucial en microscopie de pouvoir créer et optimiser le contraste.

Dans le cas d'objets semi-transparents, on a souvent recours en biologie à l'utilisation de sondes fluorescentes ou de colorants avec la spécificité moléculaire la plus élevée possible de façon à pouvoir étudier l'échantillon avec une sensibilité (voire une résolution) pouvant aller jusqu'à la molécule unique. On verra dans le premier chapitre de ce manuscrit que la fluorescence permet la localisation de molécules uniques, l'étude de phénomènes dynamiques comme des interactions entre molécules, ou encore de quantifier des vitesses de diffusion.

---

La fluorescence est un outil inégalé en ce qui concerne l'étude de molécules individuelles et au delà de l'important contraste, on peut également obtenir des informations quantitatives. Cependant, il existe certaines limitations à l'utilisation de la fluorescence et qui seront évoquées plus en détail dans la suite, comme la photo-toxicité ou le photo-blanchiment.

De ce fait, des techniques de contraste de phase ont été remises au goût du jour en raison de l'augmentation de contraste qui est permise et ce, sans marquage. Dans les années 30, le microscope a contraste de phase de Zernike [1] est inventé, valant un prix Nobel à son inventeur en 1953. Cette technique qualitative est basée sur de l'interférométrie et permet grâce à une atténuation et un déphasage de la lumière n'ayant pas été diffractée par l'échantillon de générer du contraste.

Quelques années plus tard, apparaît une seconde technique interférométrique elle aussi intrinsèquement qualitative : le contraste interférentiel différentiel par Nomarski [2]. Ces deux techniques sont utilisées aujourd'hui en routine dans les laboratoires et permettent d'augmenter le contraste d'objets semi-transparents tels que des cellules et des tissus et permettent notamment suivi et comptage de population cellulaire.

Avec le besoin d'aller au delà du contraste et de réaliser des quantifications, des techniques cette fois-ci quantitatives se sont développées avec pour objet de mesurer le déphasage introduit par un échantillon.

Ces techniques interférométriques seront présentées plus en détail dans le chapitre introductif de ce manuscrit. Leur principe est simple : permettre l'imagerie d'échantillons semi-transparents sans marquage et se sont révélées particulièrement adaptées pour réaliser une quantification de grandeurs comme la masse sèche de cellules ou l'indice de réfraction d'échantillons.

Dans ce contexte, la microscopie de phase quantitative s'inscrit comme un outil parfaitement approprié à l'extraction d'information quantitative d'un échantillon.

### **Enjeux :**

La technique utilisée dans les travaux qui seront présentés apporte du contraste mais est avant tout quantitative. Cela signifie qu'on peut quantifier une grandeur, en l'occurrence un déphasage introduit par un échantillon, et en déduire de nouvelles variables utilisables et compréhensibles pour les personnes travaillant dans un domaine biologique.

Les questions importantes qui se posent sont : que signifie être quantitatif ? et en particulier en biologie ? Quelle variable peut être quantifiée et avec quelles incertitudes ? Quelles informations peuvent être déduites de ces mesures ?

Il est nécessaire pour réaliser cette étude de définir le cadre de la mesure et les paramètres qui influenceront sur celle-ci.

On peut trouver dans la littérature une définition du mot *métrologie* : *la métrologie est une science de la mesure qui englobe les connaissances qui permettent d'attacher au résultat d'une mesure la signification exacte qu'on peut en attendre dans des conditions de mesure données. Elle s'intéresse à tous les éléments qui entrent en jeu et s'attache particulièrement à analyser les causes d'erreur.*

---

L'enjeu de cette thèse est de démontrer la notion de quantification dans le cadre de différentes applications développées grâce à notre outil de mesure. Il s'agit également de définir les sources de réduction de la précision de quantification et les différents bruits ainsi que les incertitudes de mesure.

### **Démarche adoptée dans ce manuscrit :**

Les erreurs lors d'une mesure sur un échantillon peuvent être introduites par l'échantillon, le système d'imagerie ou encore par le détecteur et se traduisent par des inexactitudes ou des imprécisions dans la mesure. La précision est importante dans le cadre où l'on veut réaliser une quantification sur des échantillons biologiques. En effet, on ne peut souvent réaliser qu'une seule fois la mesure finale (un seul *time lapse*, série d'images prises à des moments différents pour présenter en un laps de temps court l'évolution de l'objet étudié sur une période longue ou une seule image à un instant  $t$ ). De plus, les spécimens biologiques peuvent avoir une forte variabilité, la variance des mesures réalisées est ainsi causée par l'échantillon et par la mesure elle-même.

En métrologie, il est important de déterminer la performance d'un système de mesure, c'est à dire la capacité pour l'appareil de détecter une variabilité réelle de l'échantillon. Le test de Gage R & R permet de quantifier cette performance en mesurant le rapport entre les variabilités des mesures de l'instrument et celles des échantillons d'intérêts. Pour garantir une bonne qualité d'instrument, un rapport de 1/3 donne une probabilité de détection de 99.7%. Il faut donc arriver à répertorier et à réduire au maximum les sources d'inexactitude et d'imprécision afin de connaître son domaine de validité et sa pertinence. Le bruit, en introduisant une variance des valeurs des pixels de l'image, est la cause d'imprécisions de mesure. La précision des mesures est donc limitée en imagerie par le rapport signal sur bruit.

Le manuscrit est divisé en différents chapitres. Le premier chapitre est une introduction aux techniques permettant une quantification sur des échantillons biologiques. On détaillera les différentes grandeurs qui sont quantifiables à l'échelle moléculaire grâce à la fluorescence et on présentera en détail les grandes techniques de phase quantitatives qui sont similaires à celle utilisée dans mes travaux de thèse.

Les deux chapitres suivants ont pour objet la présentation de deux applications bi-dimensionnelles développées pour l'étude d'échantillons isotropes et anisotropes. On introduira pour cela le modèle projectif qui permettra d'établir les conditions d'une quantification dans le cadre de la mesure de différence de chemin optique.

Le second chapitre a pour objet de montrer la possibilité de réaliser des classifications cellulaires grâce à une mesure de masse sèche.

Le troisième chapitre est relatif à la mesure de biréfringence d'échantillons biologiques. On verra comment on peut obtenir un contraste spécifique des structures biréfringentes au sein de cellules.

Les performances de la mesure ainsi que les erreurs et incertitudes seront définies pour chacune de ces applications à l'aide d'échantillons connus et de simulations.

---

Le dernier chapitre représente le passage de la mesure bi-dimensionnelle à une mesure tri-dimensionnelle en jouant sur l'illumination. On verra que l'enjeu est de rester quantitatif lors de l'observation d'échantillons épais lorsque l'approximation projective n'est plus applicable. L'intérêt de cette imagerie tri-dimensionnelle est la quantification d'un échantillon tranche par tranche afin de pouvoir déterminer un nombre de couches cellulaires ou de pouvoir dimensionner des organites au sein de cellules ou tissus.

---

## Techniques en microscopie quantitatives en biologie

---

En microscopie classique, l'image obtenue dans le plan image du microscope est issue des interférences entre lumières transmise et diffractée par l'échantillon. Dans le cas d'un échantillon transparent, l'intensité de la lumière transmise étant bien supérieure à celle diffractée, le contraste est très faible. Il est donc nécessaire de trouver un moyen de remédier à cette absence de contraste.

Une des solutions les plus utilisées classiquement est de marquer l'échantillon à l'aide de sondes fluorescentes. L'augmentation de contraste est très efficace et une visualisation moléculaire spécifique est permise. Néanmoins, pour des raisons de photo-toxicité essentiellement, on cherche de plus en plus à trouver un moyen de créer du contraste sans utiliser la fluorescence. Ceci est possible en utilisant une propriété intrinsèque de la lumière à savoir sa vitesse qui dépend de l'indice de réfraction du milieu afin de créer du contraste en fonction du déphasage introduit par l'échantillon comme on le verra dans la seconde partie de ce chapitre.

En fonction des grandeurs qu'il est possible de quantifier à la fois en fluorescence et en phase, on décrira quelques techniques de fluorescence très succinctement et l'on s'attardera plus longuement sur les techniques de phase qui font l'objet du travail réalisé dans la suite de ce manuscrit.

### 1.1 Techniques quantitatives utilisant la fluorescence

Actuellement, la fluorescence représente la technique la plus sensible pour détecter des molécules. Le contraste permet d'accéder à des données quantitatives donnant accès à des études d'interactions, des dynamiques d'associations/dissociations ou encore des orienta-

tions au niveau d'une population de molécules. L'intérêt d'utiliser la fluorescence est liée au fait qu'une augmentation de contraste et une visualisation de molécules uniques avec une résolution allant jusqu'à la dizaine de nanomètres peuvent être réalisées de façon spécifique en microscopie optique.

### 1.1.1 Le phénomène de fluorescence

Rappelons brièvement le principe de la fluorescence. La fluorescence est une émission lumineuse provoquée par l'excitation d'une molécule après absorption de photons et qui va se désexciter en émettant de la lumière. Une fois l'énergie du photon absorbée, la molécule se trouve dans un état électroniquement excité noté  $S_1$  sur le schéma présenté Figure 1.1. Le retour à l'état fondamental peut se faire de différentes manières : soit par fluorescence, soit par phosphorescence suivant la structure des niveaux énergétiques de la molécule. Le diagramme de Jablonski (Figure 1.1) permet de visualiser les différents processus qui sont mis en jeu au cours des transitions entre états : absorption d'un photon, conversion interne, fluorescence, phosphorescence...

La fluorescence est caractérisée par l'émission d'un photon de manière très rapide ( $10^{-9}$  -  $10^{-7}$  s) par rapport à la phosphorescence ( $(10^{-3}$  -  $10^2$ s), qui, quant à elle est caractérisée par une transition d'un état  $S=0$  vers un état  $S=1$  (état triplet).

La durée de vie moyenne de la molécule dans l'état excité  $S_1$  varie entre  $10^{-10}$  et  $10^{-7}$  s. En raison de la perte d'énergie par relaxation vibrationnelle lors des processus de conversion interne, le spectre d'émission de fluorescence est situé à des longueurs d'ondes plus grandes que celle d'absorption. Le décalage entre les pics d'absorption et d'émission de fluorescence est appelé déplacement Stokes. En adaptant les filtres à l'émission et à la détection, on sélectionne uniquement le signal de fluorescence révélateur de la présence d'une molécule fluorescente.

On définit le rendement quantique de fluorescence comme le rapport entre le nombre de photons émis lors de la transition  $S_1/S_0$  et le nombre de photons absorbés. Le rendement quantique est une caractéristique importante d'une molécule fluorescente qu'il est bon de prendre en compte lors des expériences réalisées.

En effet, en microscopie de fluorescence, la valeur d'intensité d'un pixel est reliée au nombre de fluorophores présents dans la zone correspondante de l'échantillon. Plus la molécule réémet de photons, meilleur est le rapport signal sur bruit de l'image et plus les erreurs réalisées sur la localisation ou sur une mesure d'intensité de fluorescence est diminuée.

La quantité de photons émis et détectée par le capteur est liée au nombre de fluorophores dans l'échantillon. En calibrant la mesure avec des échantillons étalonnés, on peut avoir une mesure de densité relative des fluorophores.

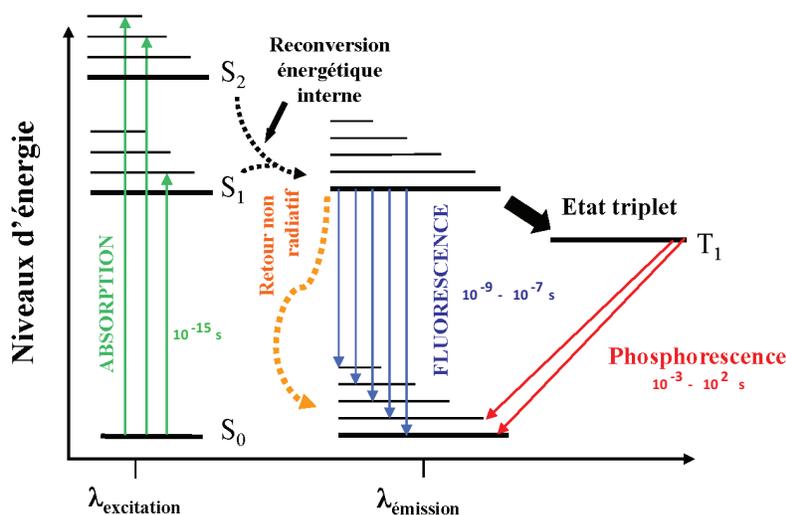


FIGURE 1.1 – Schéma représentatif des processus de relaxation qui entrent en compétition après le passage d'une molécule dans un état excité. L'axe vertical est un axe en énergie, tandis que les états sont groupés horizontalement selon leur multiplicité de spin. Les transitions radiatives sont symbolisées par des flèches droites et les transitions non-radiatives par des flèches ondulées. L'état vibrationnel fondamental de chaque état électronique est représenté par une ligne épaisse et les autres états vibrationnels par une ligne fine. L'absorption d'un photon incident peut porter une molécule dans l'un des états vibrationnels de  $S_1$ ,  $S_2$  ...

### 1.1.2 La fluorescence comme outil de localisation

A partir d'une image en contraste de fluorescence, on peut extraire différentes informations quantitatives quant à la localisation de la molécule étudiée dans l'échantillon. La résolution que l'on peut atteindre avec certaines techniques dites *de super-résolution* de type STORM (pour Stochastic Optical Reconstruction Microscopy) ou PALM (pour PhotoActivated Localization Microscopy) les rend tout fait adaptées à des études de localisation de molécules. Ces techniques, qui utilisent des activations séquentielles et une localisation résolue en temps de molécules photo-convertibles, permettent de réaliser des mesures de distance entre particules ou des corrélations de positions de molécules grâce à l'étude de la localisation des barycentres d'intensité et leur répartition sur les images. Il faut pour cela que certaines conditions soient remplies : les particules doivent être suffisamment résolues et ponctuelles et leur concentration dans le milieu doit être faible afin de pouvoir discerner les signaux provenant de chacune d'entre elles.

Les avantages de la fluorescence pour ces applications sont nombreux : le côté ponc-

tuel de l'émission de lumière permet une localisation précise et l'incohérence spatiale de l'émission permet d'accéder à des résolutions latérale et axiale supérieures à celles obtenues en éclairage spatialement cohérent. Aussi, la possibilité de déconvoluer les images avec la réponse du système d'imagerie qui peut être déterminée de façon simple (la notion de déconvolution sera traitée dans le chapitre 4) est un atout qui permet d'augmenter numériquement la résolution et diminuer le bruit des images.

### 1.1.3 La fluorescence comme outil de mesure de dynamique moléculaire

La fluorescence peut être utilisée dans le cadre de l'étude de dynamiques de diffusions de molécules, de caractérisations d'associations moléculaires et peut donner des informations comme des vitesses d'association/dissociation par exemple.

Il existe de multiples techniques permettant ce type d'études. On ne s'intéressera ici qu'à quelques unes d'entre elles.

La cytométrie de flux est également une technique quantitative très utilisée notamment pour l'étude et la classification de cellules. La lumière diffractée suivant différentes directions est détectée et apporte des informations de structure, de compositions ainsi que de dimension des objets passant au niveau d'un point focal laser. Inventée dans les années 50, la cytométrie en flux est une technique permettant de caractériser et de compter des objets (pouvant aller de la molécule unique à des organismes cellulaires) entraînés par un flux de liquide ou de gaz à travers un faisceau laser ou une lampe à arc.

Certaines applications de cette technique sont relatives à une étude du cycle cellulaire, le but étant de classer des cellules en fonction de l'étape du cycle dans lequel elles sont [3, 4]. De façon non exhaustive, on peut également citer les mesures d'activité métabolique [5] ou les analyses immunologiques [6]. De multiples paramètres peuvent être déduits d'un échantillon et permettre de réaliser des classifications multiparamétriques de populations cellulaires constituées d'un très grand nombre d'individus (analyse de plusieurs milliers d'événements par seconde), ainsi que du tri cellulaire.

Dans le cadre de l'étude de molécules au sein d'une solution, la spectroscopie de corrélation de fluorescence appelée FCS (*pour* Fluorescence Correlation Spectroscopy) [7] est une des techniques permettant de suivre des phénomènes moléculaires dynamiques la plus utilisée. On crée un volume de détection en focalisant un laser en un endroit et en confinant la détection axialement. C'est pourquoi en général, on utilise cette technique couplée à de la microscopie confocale afin de réduire le volume de détection au maximum. Les signaux de fluorescence étant faibles, des détecteurs ultra sensibles de type photodiodes à avalanche sont utilisés afin d'être en mesure de capter un signal lumineux.

Elle est utilisée de façon courante et peut être ajoutée de façon commerciale en tant que module à un montage expérimental pré-existant. Cette technique est basée sur une analyse

statistique de fluctuations d'intensité grâce à une fonction de corrélation. A partir d'une mesure d'une fluctuation d'intensité créée par la diffusion d'une molécule au sein du point focal d'excitation d'un laser, on peut déduire directement des informations quantitatives diverses comme des concentrations, des informations sur la motilité ou des interactions de molécules.

En effet, des coefficients de diffusion, des taux de fluorescence dans le volume moyen d'observation ou encore des informations sur la brillance d'une molécule peuvent être déduites ainsi que des caractérisations d'associations moléculaires comme des vitesses d'association/dissociation.

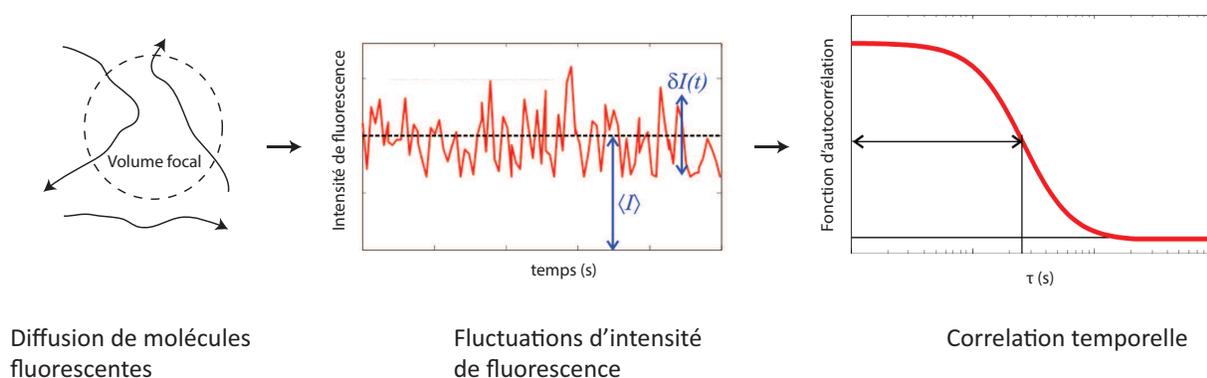


FIGURE 1.2 – Schéma de principe de la spectroscopie de corrélation de fluorescence.

Il existe des techniques en champ large plus faciles d'implémentation et permettant de mesurer des diffusions et des temps de vie de fluorescence au sein d'un échantillon. Intéressons-nous à la mesure de diffusion de molécules fluorescentes par FRAP (*pour* Fluorescence Recovery After Photobleaching). Le phénomène de photo-blanchiment, qui n'a pas été abordé jusqu'ici, fait partie des inconvénients de la fluorescence. On peut néanmoins tirer avantage de la dégradation des molécules fluorescentes en étudiant la vitesse de regain de fluorescence dans une zone photo-blanchie au préalable. Le temps de retour de la fluorescence dans cette zone correspond à une diffusion des molécules fluorescentes qui vont venir remplacer les molécules photo-blanchies. Cette technique requiert une série d'acquisition d'images de fluorescence dans le temps après avoir créé un phénomène de photo-blanchiment dans une zone de l'échantillon.

Une dernière technique que l'on citera dans le cadre des mesures de dynamiques est le FLIM (*pour* Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy) qui permet de mesurer des temps de vie de fluorescence qui sont influencés par l'environnement de la molécule ou la conformation. Le but est d'illuminer l'échantillon avec une impulsion courte et de mesurer le temps de décroissance de la fluorescence. On peut également comparer le comportement des molécules fluorescentes en fonction de leur environnement.

### 1.1.4 La fluorescence comme outil de mesure de l'orientation moléculaire

En utilisant une lumière polarisée, on sonde l'orientation locale d'un échantillon en mesurant une anisotropie de fluorescence. Le principe est simple : on va exciter l'échantillon avec une lumière polarisée et détecter les intensités de fluorescence dans les directions parallèles et perpendiculaires à la polarisation d'excitation.

Cette technique permet l'étude de l'organisation structurale des protéines et des lipides. Ce genre d'organisation en biologie est une signature de mécanismes d'interaction moléculaire des protéines et des lipides, ce qui joue un rôle déterminant dans les fonctions biologiques de maintien de la forme et de la motilité cellulaire. L'orientation des lipides au sein de la membrane est fonction de l'organisation et du contenu membranaire. La présence d'éléments comme le cholestérol ou de protéines trans-membranaires au sein de la membrane par exemple, entraîne une modification de sa fluidité. En conséquence, si l'on est en mesure d'avoir une indication de l'organisation locale des lipides au niveau de la membrane, on peut en déduire des aspects architecturaux et dynamiques de la membrane plasmique.

L'équipe de Brasselet et al. de l'Institut Fresnel à Marseille a étudié un montage sur microscope confocal pour réaliser des mesures d'anisotropie de fluorescence point par point sur cellules [8]. Le signal de fluorescence mesuré est un signal correspondant à l'orientation moyenne de tous les dipôles des molécules fluorescentes dans le volume confocal.

### 1.1.5 Conclusion

En conclusion de cette partie descriptive de quelques techniques quantitatives utilisant le phénomène de fluorescence, on a mis en évidence l'atout principal de la fluorescence qui est de permettre une imagerie et des mesures moléculaires spécifiques. La résolution des images de fluorescences est aussi un avantage important. En effet, elle peut aller jusqu'à une dizaine de nanomètres en résolution latérale, ce qui nous autorise à réaliser des localisations très précises de fluorophores.

Des données quantitatives relatives à un échantillon biologique peuvent être extraites comme une concentration, une vitesse de diffusion ou des paramètres structuraux ou de composition interne. Grâce à ces techniques, on va pouvoir comparer, classifier et mettre en évidence des modifications d'architecture ou d'organisation d'un échantillon.

La fluorescence a néanmoins quelques inconvénients relatifs au marquage qu'elle nécessite. L'inconvénient majeur est l'effet du marquage sur les éléments étudiés. Dans le cas où l'on étudie une molécule unique ou une interaction entre deux molécules, on peut supposer que le marquage n'influence que très peu le phénomène. Par contre, dans le cas où l'échantillon est un organisme vivant, on peut raisonnablement supposer que le marquage, le plus souvent exogène, va perturber l'échantillon en plus du caractère photo-toxique de la fluorescence. Aussi, on utilise des molécules fluorescentes de dimensions de l'ordre de

celle de la molécule à laquelle elles sont attachées, on peut également penser qu'elles vont modifier le comportement "natif" des molécules.

Un second inconvénient inhérent à l'utilisation de la fluorescence est le photo-blanchiment des molécules fluorescentes. Outre le fait que ce phénomène peut être utilisé comme on l'a montré précédemment pour étudier la cinétique de diffusion de molécules, c'est une réelle limitation qui empêche l'utilisation d'une lumière trop intense et impose une durée limitée d'expérience. Le faible signal de fluorescence qui est émis par une molécule individuelle nécessite par conséquent des temps d'intégration assez longs pour obtenir un rapport signal sur bruit correct en évitant l'utilisation de lumière intense.

D'un point de vue technique, il peut être nécessaire de calibrer les dimensions du volume de détection par exemple, comme dans le cas de la FCS, en utilisant une solution de concentration connue. L'intensité mesurée peut être influencée par des paramètres optiques du système tel que ses aberrations mais aussi la puissance et les fluctuations du laser. Certaines contraintes comme les variations d'émission de fluorescence, les agrégats de particules, la viscosité de la solution sont d'autres paramètres délicats qu'il faut prendre en compte.

Dans le cadre de l'étude d'échantillons biologiques, des informations morphologiques en plus des informations spécifiques obtenues avec la fluorescence peuvent être intéressantes pour avoir une idée de l'environnement et de l'état global de la cellule par exemple. Un couplage d'une imagerie spécifique d'une molécule avec une imagerie en champ large serait pertinent. On observe depuis quelques années, un regain d'intérêt pour des techniques n'utilisant pas de marquage en complément des techniques de fluorescence. En effet, la photo-toxicité ou encore le photo-blanchiment sont autant d'arguments pour éviter ou du moins réduire au maximum tout marquage fluorescent.

## 1.2 Techniques dédiées au contraste de phase quantitatif

En utilisant uniquement la propriété de la lumière de se propager à des vitesses différentes en fonction de la répartition d'indice de réfraction, on peut créer du contraste sans marquage et mesurer le déphasage introduit par l'échantillon, ce qui peut mener à des mesures de masse sèche de cellules ou d'indice de réfraction comme on le montrera dans la suite.

L'information de phase est perdue habituellement du fait de la résolution temporelle insuffisante des détecteurs classiques (œil, caméras CCD...). Les détecteurs sont par conséquent uniquement sensibles à l'intensité du champ  $\mathcal{EM}$ . L'idée générale des techniques suivantes est de moduler grâce à un phénomène d'interférences, l'intensité du champ  $\mathcal{EM}$  avec l'information de phase. L'intérêt des techniques d'imagerie de phase est qu'elles permettent

de visualiser l'échantillon dans sa globalité.

Parmi les techniques quantitatives ne nécessitant aucun marquage, on retrouve les techniques du type SHG (pour *Second Harmonic Generation*), THG (pour *Third Harmonic Generation*) ou encore la microscopie CARS (Coherent anti-Stokes Raman scattering) basées sur des phénomènes d'optique non-linéaire et permettant de créer du contraste en fonction de certaines propriétés du milieu considéré. On peut également citer toutes les techniques interférométriques de phase quantitative [9, 10, 11, 12]. En effet, une source de contraste possible réside dans le fait que la lumière ne va pas se propager à la même vitesse en fonction de la répartition d'indice au sein de l'échantillon. On sait que la vitesse de propagation locale de la lumière au sein d'un milieu est inversement proportionnelle à l'indice de réfraction du milieu. Plus l'indice est grand et plus l'onde sera ralentie durant sa propagation.

Le caractère quantitatif de ces techniques et leur non-invasivité en font un outil particulièrement adapté à la réalisation de mesures sans photo-toxicité induite

Les techniques de phase quantitatives sont aujourd'hui classiquement utilisées en microscopie pour l'imagerie d'échantillons biologiques ou semi-transparents avec, comme on le verra par la suite, des applications diverses telles que la mesure de masse de cellules et leur classification, des études de dynamique membranaire, des mesures de biréfringence ou encore de la reconstruction tomographique.

De façon générale, on peut regrouper les différentes techniques en deux grandes catégories en fonction de l'existence ou non d'un bras de référence. Lorsque l'interféromètre est constitué d'un seul bras, la configuration est dite en *common path* et le faisceau servant de mesure et celui de référence suivent le même chemin optique. La configuration alternative est le *double path* où deux faisceaux sont créés, l'un servant de référence, et l'autre de bras de mesure.

### 1.2.1 La microscopie holographique

La microscopie holographique est la technique de mesure de phase quantitative la plus répandue dans la communauté scientifique. Cette technique a bénéficié d'un regain d'intérêt [9] avec l'avènement des techniques numériques qui ont permis de passer d'un enregistrement sur plaque photographique à l'utilisation d'un détecteur numérique. Les premiers travaux concernant son application pour l'imagerie datent de 1999 et sont relatifs à l'équipe de Depeursinge et al [9] avec la première application à l'imagerie cellulaire six ans plus tard [13].

Le principe de la microscopie holographique est le suivant (voir Figure 1.3) : un faisceau incident spatialement et temporellement cohérent est envoyé sur l'échantillon. Le faisceau diffracté va être collecté par l'objectif et interférer sur le détecteur avec le faisceau *référence* ayant traversé un objectif identique qui réalise une compensation afin que la seule différence entre les 2 faisceaux soit la traversée de l'échantillon.

L'interférogramme enregistré par le détecteur est ensuite traité dans l'espace de Fourier afin d'en déduire le déphasage introduit par l'échantillon.

L'idée générale de toutes ces techniques est de moduler l'intensité mesurée par le détecteur avec l'information de phase. Sous cette appellation, peuvent être regroupées toutes les techniques de microscopie optique utilisant, pour la mesure quantitative de la phase, un interféromètre comportant deux bras : un dit *mesure* et un dit *référence*. Ces techniques sont à opposer aux techniques n'utilisant qu'un unique bras portant à la fois le faisceau de mesure et celui de référence.

Il existe plusieurs façons de moduler le signal : temporellement ou spatialement.

### 1.2.1.1 La microscopie holographique *hors axe* ou *double path*

Les techniques temporelles vont introduire des déphasages différents entre le bras de mesure et le bras de référence et reconstruire une image à partir de différentes acquisitions successives à mesure que le déphasage est modifié. Le codage de l'information est hétérodyne et permet de réaliser des interférogrammes dont le nombre de points de mesures est identique au nombre de pixels du détecteur. Le type de montage est un montage dit *sur l'axe*. Il est nécessaire d'utiliser une série d'acquisitions en faisant varier le retard de phase du modulateur et d'appliquer un algorithme d'interférométrie à décalage de phase afin d'en extraire la phase. Cette approche présente l'avantage de fournir des images ayant le même nombre de points de mesure que le nombre de pixels de la caméra.

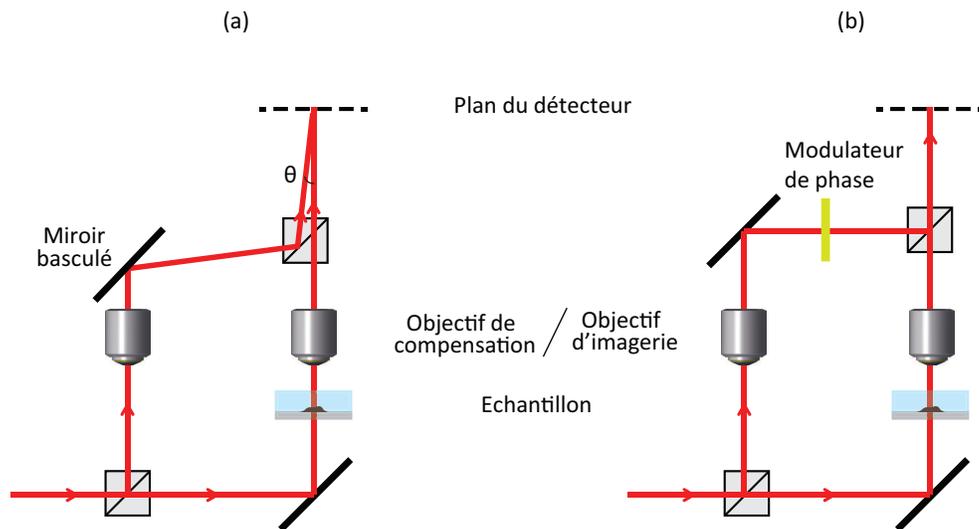


FIGURE 1.3 – Schéma de principe d'un montage d'holographie numérique en configuration (a) hors d'axe et (b) sur l'axe.

On peut citer différents travaux basés sur l'utilisation de l'holographie numérique : l'équipe de l'université de Münster de Kemper et al.[14] applique cette technique avec

un montage *hors d'axe* pour réaliser l'imagerie d'échantillons biologiques de cellules et de tissus et l'utilise notamment pour la mesure de masse de cellules en biologie (processus de croissance cellulaire), l'étude morphologique lors d'une infection [15] et dernièrement l'étude des modifications tissulaires (densité, inflammation) grâce à une mesure d'indice de réfraction moyen [16].

En 2011, l'équipe de Choi de l'université de Séoul présente une adaptation de ce montage [17] utilisant un réseau de diffraction et un système de filtrage physique des ordres de diffraction rappelant la méthode que l'on verra partie 1.2.2. Le montage, présenté en Figure 1.4, est réalisé en configuration hors d'axe avec une illumination speckle dynamique créée par l'association d'un laser He-Ne et d'un diffuseur rotatif. On rappelle que le phénomène de *speckle*, ou *tavelure* en français, est dû aux interférences multiples lorsqu'on est en présence d'un phénomène de diffusion d'une lumière cohérente temporellement. Les avantages de la technique sont l'amélioration des résolutions latérales et axiales jusqu'à deux fois par rapport à une illumination cohérente conventionnelle.

L'inconvénient de cette technique réside principalement dans son implémentation complexe et dans l'impossible utilisation d'une illumination oblique.

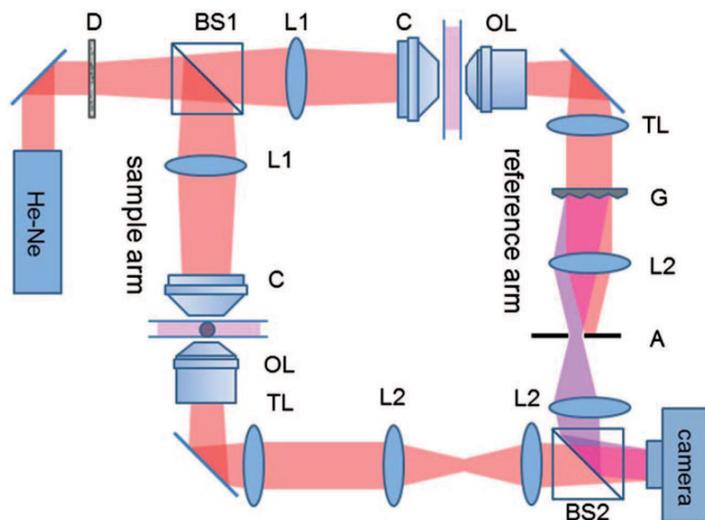


FIGURE 1.4 – Schéma de principe du montage de microscopie de phase quantitative grâce à l'utilisation d'une illumination speckle dynamique [17]. On décrit les différents éléments du montage : D, diffuseur monté sur un moteur électrique afin de pouvoir le faire bouger ; BS1 et BS2, cubes séparateurs ; L1, L2 et TL lentilles de focales respectives 250, 250, and 200 mm ; C, condenseur ; OL, lentille de l'objectif utilisé ; G, réseau de diffraction ; A, diaphragme qui permet de sélectionner l'ordre de diffraction zéro. Le faisceau est basculé grâce au cube BS2.

Les équipes du MIT de Michael S. Feld [18] utilisent également un type de montage similaire avec un module acousto-optique afin de basculer le faisceau de référence. Ce même

montage utilisé avec un miroir galvanométrique placé entre condenseur et objectif permettant de tilter l'illumination a permis de réaliser des reconstructions tomographiques [19] en se basant sur le principe de l'illumination oblique développé en tomographie diffractive comme on le verra dans le chapitre 4.

### 1.2.1.2 La microscopie holographique *sur l'axe* ou *common path*

Les techniques spatiales utilisent un montage de type *hors d'axe* avec un faisceau de référence faisant un angle  $\theta$  avec le faisceau image. Avec un montage *sur l'axe*, un modulateur de phase est ajouté au niveau du bras *référence* ou du bras *image* et l'angle entre les deux faisceaux est supprimé.

Les techniques spatiales reposent sur un encodage de la phase en un seul interférogramme portant l'information de phase générée par un tilt du faisceau référence par rapport au faisceau image.

L'inconvénient de ce type d'interféromètre est qu'on ne peut pas distinguer l'information de phase de celle d'intensité sans faire d'interférométrie à décalage de phase [20] et les images possèdent un nombre de points réduits par rapport à celles issues de techniques *hors d'axe*.

On peut également citer les travaux des équipes d'Olivier Haeberlé et al. [21, 22] de l'université de Haute Alsace et d'Hugues Giovannini et al. [23] de l'Institut Fresnel de Marseille qui travaillent également avec un type de montage holographique en configuration *sur l'axe* dans le cadre d'applications de reconstruction tridimensionnelle de la permittivité d'un échantillon via une technique de tomographie diffractive. On s'intéressera plus en détail à ces travaux dans le chapitre traitant de la reconstruction d'échantillons en trois dimensions (chapitre 4).

### 1.2.2 Microscopie de phase par diffraction sur un réseau

Cette technique, inventée par l'équipe de Michael S. Feld (MIT) [24] est une adaptation de la technique d'holographie numérique en configuration *sur l'axe* qui est implémentable sur microscope, l'échantillon étant placé à l'extérieur de l'interféromètre. Ce montage permet de réaliser une mesure avec un seul interférogramme en utilisant un réseau de diffraction au niveau du plan image du microscope et d'un système de filtrage dans l'espace de Fourier. Le but est de créer un interféromètre faisant interférer l'ordre 0 et l'ordre 1 diffractés par le réseau. Par analogie avec la microscopie holographique, l'ordre 0 correspond à la partie non diffractée du faisceau et constituera le faisceau de référence et l'ordre 1 représente la partie diffractée du faisceau et constituera le faisceau de mesure.

L'avantage de cette technique est la configuration *sur l'axe* du montage, le faisceau servant à la fois de bras de référence et de mesure. Le principal inconvénient vient de la nécessité de filtrer physiquement les ordres de diffraction pour créer un champ de référence et un champ de mesure. Le filtre spatial est un objet opaque percé ne laissant passer que

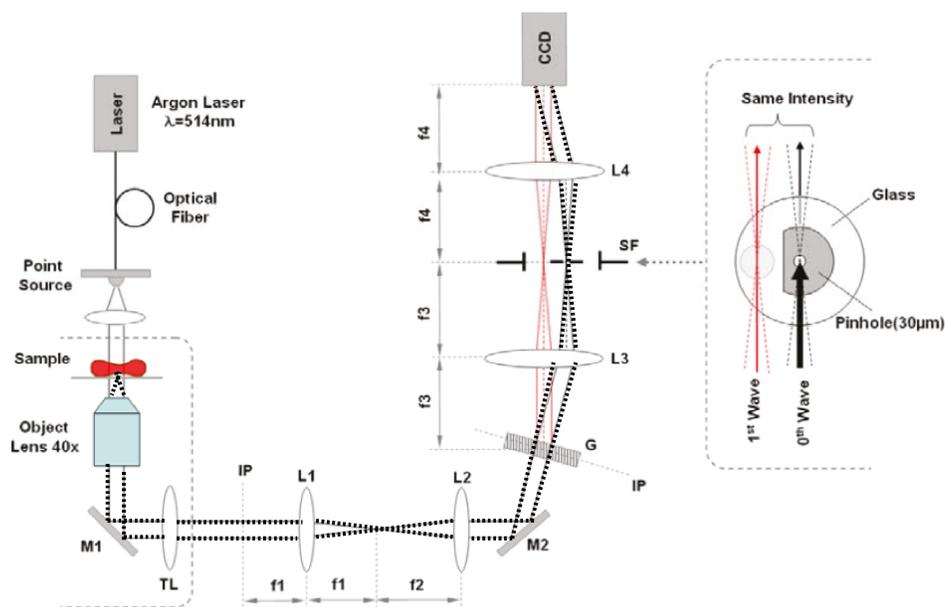


FIGURE 1.5 – Schéma de principe d'un montage de microscopie de phase par diffraction sur un réseau [24]. F1 et F2 : filtres ; M1, M2 : miroirs ; L1-4 lentilles de focales respectives  $f_1$ -4 ; G : réseau ; SF : filtre spatial ; IP1, 2 : plans images ; SF : filtre spatial.

l'ordre 0, filtré, et l'ordre 1.

Il faut veiller à chaque fois que l'information de la partie diffractée ne soit pas coupée afin de ne pas perdre d'information et de résolution. De plus, on peut noter qu'en fonction de l'illumination (alignement et longueur d'onde principalement), les dimensions des trous de filtrage et leur position peuvent varier. Un autre inconvénient que l'on peut citer est la sensibilité de ce montage aux aberrations et l'apparition de halos autour des structures due au filtrage effectué.

En 2012 [25], ce montage a été modifié pour permettre l'utilisation de la lumière blanche du microscope pour réaliser une imagerie de phase quantitative moins soumise au speckle dû à l'utilisation d'une illumination laser. Le montage présenté précédemment obligeait l'utilisation d'une source lumineuse temporellement et spatialement cohérente.

Le masque de filtrage est remplacé par un SLM ce qui permet une plus grande flexibilité concernant le filtrage spatial des ordres de diffraction.

De façon similaire, on peut citer une autre adaptation plus compacte de cette technique en réflexion développée par N.T Shaked de l'Université de Tel Aviv utilisant un système de miroirs et de lame semi-réfléchissante afin de créer un faisceau référence grâce à un filtrage fréquentiel de l'ordre 0 par un trou et qui va être recombinaison pour interférer avec l'autre faisceau [26]. L'atout d'un tel montage est sa compacité et sa potentielle utilisation avec un éclairage peu cohérent spatialement. Le système est auto-référencé et stable et peut être

utilisé en configuration *sur l'axe* ou *hors d'axe* afin de pouvoir réaliser une mesure en une seule acquisition.

### 1.2.3 Microscopie à décalage de phase

On regroupe sous ce terme les techniques qui permettent de remonter au déphasage introduit par un échantillon grâce à plusieurs mesures réalisées en utilisant des déphasages variables dans l'espace de Fourier (pupille de l'objectif). On peut faire l'analogie avec le contraste de Zernike, technique aujourd'hui utilisée en routine en imagerie, où l'on vient filtrer l'information au niveau de la pupille de l'objectif afin de ne garder que la partie du faisceau diffractée par l'objet en atténuant l'amplitude du faisceau transmis et en déphasant la partie diffractée. Le but est de diminuer l'amplitude bien supérieure du champ transmis par l'échantillon par rapport au champ diffracté. A la différence des techniques que l'on va présenter, le contraste de phase de Zernike ne permet pas de remonter à une valeur quantifiée de la phase.

On citera deux équipes travaillant avec des montages basés sur ce même principe. La première équipe est celle de Michael S. Feld (MIT) avec son microscope de phase de Fourier [27]. Le principe est le suivant : à l'aide d'un modulateur de phase, on va imprimer 4 différents déphasages et remonter à la phase grâce à une combinaison de ces enregistrements. (voir Figure 1.6). Une diode est utilisée ( $\lambda = 809 \pm 20$  nm) comme source d'illumination d'un microscope classique. Elle est rendue cohérente spatialement pour pouvoir réaliser une mesure de phase. Un système  $4f$  est utilisé afin de placer le modulateur de phase au niveau du plan de Fourier et l'image est formée sur une caméra CCD grâce à une lame séparatrice. La technique a été éprouvée sur un échantillon de microsphères, mesurées également par AFM afin de vérifier le bon accord entre ces deux mesures, et sur des globules rouges démontrant sa possible application en biologie.

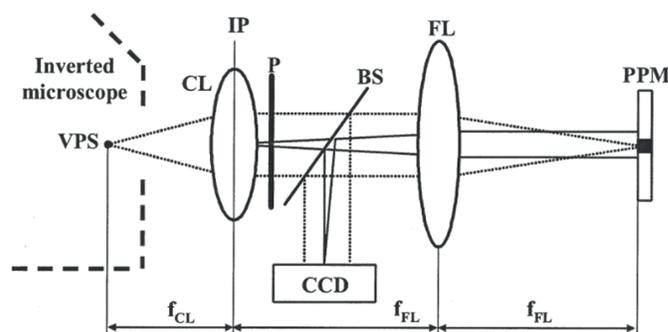


FIGURE 1.6 – Schéma de principe d'un montage de microscopie de phase de Fourier [27]. VPS : point source virtuel ; CL : lentille de correction ; IP : plan image ; P : polariseur ; BS : lame séparatrice ; FL : lentille de Fourier ; PPM : modulateur de phase programmable ; CCD : caméra.

La seconde équipe, issue de l'université d'Innsbruck en Autriche de Monika Ritsch-Marte, a développé un montage d'holographie hors d'axe dont le principe a été démontré dans [28]. Le montage a été adapté pour l'imagerie de phase quantitative d'objets complexes [29] (voir Figure 1.7) où l'on vient introduire une série d'au minimum 3 déphasages de  $0$ ,  $2\pi/3$ ,  $4\pi/3$  connus à l'aide d'un SLM (*spatial light modulator*) et d'un motif appelé spirale de phase au niveau du plan de Fourier du système d'imagerie. Une lumière blanche est utilisée, ce qui rend une implémentation sur microscope possible. Un système  $4f$  est utilisé afin de faire coïncider le SLM et le plan de Fourier de l'image. Le premier ordre de diffraction est envoyé sur un miroir placé dans le plan focal image d'une lentille et ajusté de sorte que le faisceau réfléchi traverse à nouveau la lentille qui le focalise au niveau du SLM où un motif à la même fréquence que la spirale de phase est imprimé de sorte à compenser la dispersion. Cette méthode, éprouvée sur un échantillon dont le déphasage est connu, nécessite une calibration avant de réaliser une mesure afin de permettre une mesure précise du déphasage introduit par un échantillon.

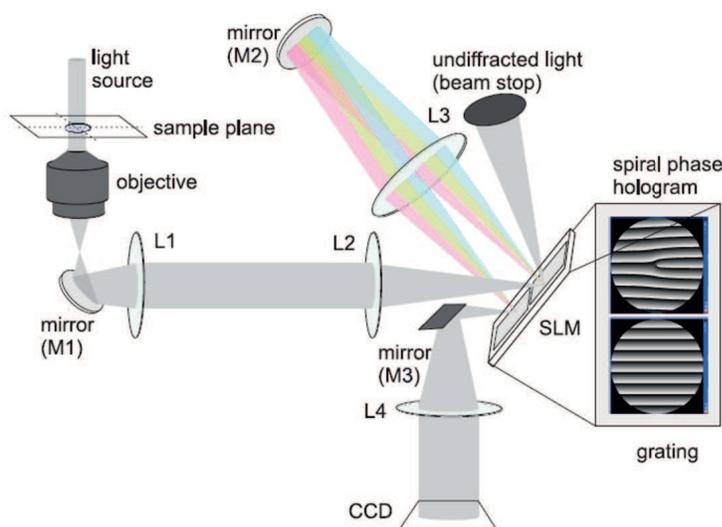


FIGURE 1.7 – Schéma de principe d'un montage de la technique de microscopie à spirale de phase [29]. L'échantillon est illuminé par un faisceau collimaté. La lumière traverse ensuite l'objectif (NA 0.95, 63x). M1, M2 et M3 : miroirs ; L1, L2, L3 et L4 : lentilles. La transformée de Fourier est projetée sur la partie supérieure du SLM.

L'avantage de ces types de montages est leur grande stabilité par rapport à des montages avec des interféromètres à deux bras. On peut travailler directement en sortie du microscope, le montage se plaçant comme un module *add-on*. On note que pour réaliser la mesure, une source cohérente spatialement doit être utilisée comme dans le cas de la technique utilisée dans ces travaux. Il faut également travailler en lumière polarisée, ce qui peut être considéré comme une limitation dans certains cas où l'on veut travailler avec des échantillons biréfringents ou utiliser des supports en plastique.

## 1.2.4 Imagerie de phase quantitative par interférométrie à décalage quadri-latéral

Parmi les techniques de mesure du chemin optique, celle qui est au centre de mes travaux de thèse est une technique interférométrique imaginée par Jérôme Primot [30] et développée par l'entreprise Phasics.

### 1.2.4.1 Introduction à la technique

L'origine de l'interférométrie à Décalage Quadri-Latéral (IDQL) se trouve dans la recherche d'un système de mesure de surface d'onde haute résolution pour traiter des images obtenues grâce à des télescopes astronomiques, qui arrivaient déformées par leur traversée de l'atmosphère. Cette technique a été par la suite rapidement adoptée en métrologie laser pour la caractérisation et la correction des lasers impulsions intenses [31, 32].

Dans ses travaux de thèse, Pierre Bon [33] a démontré l'utilisation d'un analyseur de front d'onde basé sur cette technique interférométrique placé au niveau du plan d'imagerie d'un microscope pour réaliser une imagerie hautement contrastée d'un échantillon semi-transparent et ce, sans marquage. Il a également montré son intérêt pour obtenir une caractérisation en terme de chemin optique de l'échantillon imagé (voir Figure 1.8). On peut obtenir une valeur locale du déphasage introduit par l'échantillon en nm. Sur l'image d'OPD, plus la valeur est grande et plus l'objet apparaît foncé traduisant une forte densité optique locale de l'échantillon.

C'est dans le cadre de la microscopie d'échantillons biologiques que s'inscrivent également mes travaux de thèse.

Dans cette première partie du manuscrit, nous allons décrire le fonctionnement de l'outil utilisé en microscopie dans le but de réaliser une imagerie de phase quantitative d'échantillons semi-transparentes.

### 1.2.4.2 Création des différentes répliques

Concrètement, l'interférométrie à décalage quadri-latéral (IDQL) est basée sur une mesure bi-dimensionnelle de gradients du chemin optique obtenus par les interférences suivant chaque direction de l'espace de quatre répliques d'un même front d'onde incident qui vont être créés légèrement décalés et basculés avant d'interférer sur un capteur CDD. La zone utile, d'où pourra être extraite l'information, se situe dans la zone de superposition des différentes répliques. La figure 1.9 expose son principe de fonctionnement.

L'IDQL est basée sur le fait de faire interférer quatre répliques décalées du front d'onde à analyser. Le décalage des répliques permet de réaliser une mesure simultanée suivant les 2 directions suivant lesquelles les répliques sont décalées. Le fait qu'il existe un basculement de ces répliques dû au décalage permet quant à lui de pouvoir n'effectuer qu'une seule mesure pour obtenir les informations de phase et d'intensité. Les répliques sont générées

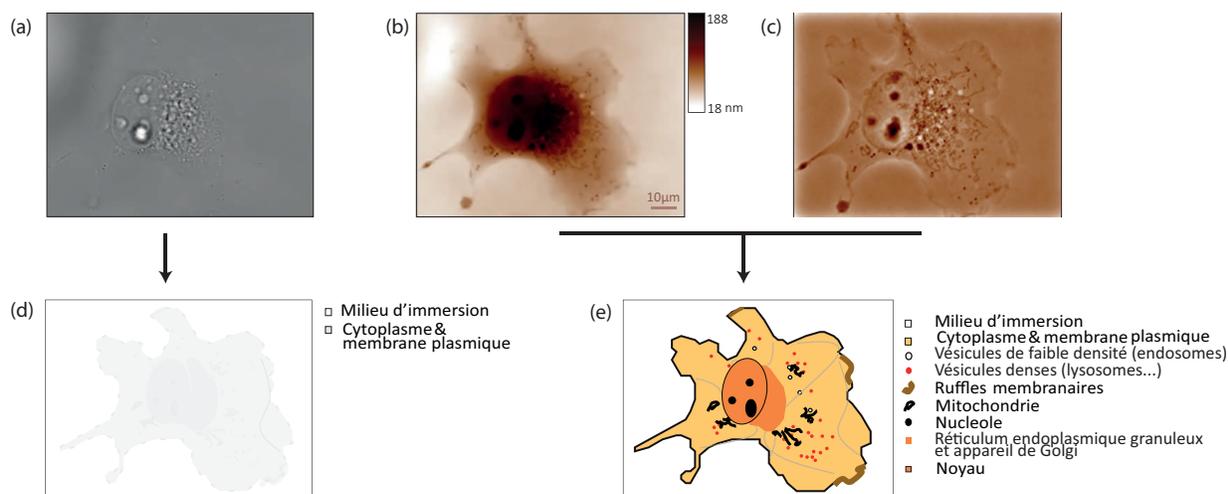


FIGURE 1.8 – Illustration de l'augmentation de contraste créée par la technique sur une cellule COS-7. Le contraste permet la visualisation et l'identification des constituants intracellulaires. (a) Image d'intensité de la cellule imagée, (b) Image d'OPD de la cellule, (c) image d'OPD avec application d'un filtre passe haut pour réhausser les détails, (d) schéma représentant les constituants identifiés sur l'image (a) et (e) représentation schématique de la cellule et de ses différents constituants identifiés sur les images (b) et (c).

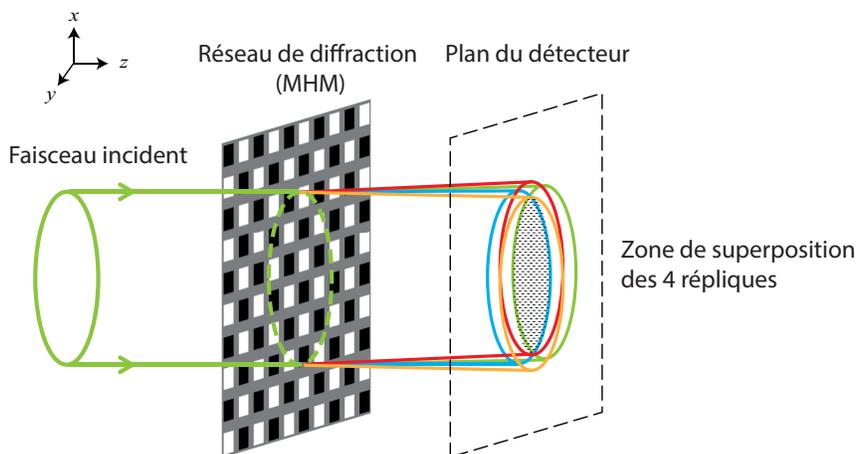


FIGURE 1.9 – Schéma de principe d'un analyseur de front d'onde à décalage quadri-latéral. Le front d'onde incident est diffracté par le MHM. Les 4 répliques créées (2 suivant  $\vec{x}$  et 2 autres dans la direction  $\vec{y}$  orthogonale) vont interférer sur le capteur CCD quelques millimètres plus loin. Le décalage entre les différentes répliques a volontairement été exagéré afin d'en illustrer le principe.

grâce à un réseau de diffraction appelé Masque de Hartmann Modifié (MHM) [34]. Le MHM, illustré en Figure 1.10, est un réseau de diffraction particulier composé d'une matrice d'ouvertures carrées de période  $pas = \Lambda/2$  et de rapport cyclique de transmission

$r = o/p$ , et d'un masque de phase déphasant un trou sur deux de  $\pi$ . Sa particularité est de ne diffracter en première approximation que 4 ordres de diffraction (ordres +1 et -1 suivant les 2 directions ( $\vec{x}$  et  $\vec{y}$ ) suivant lesquels les répliques sont décalées) [35]. Sa transmittance  $t(x, y)$  est sinusoïdale dans les deux directions ( $\vec{x}$  et  $\vec{y}$ ) de l'espace et est décrite par l'équation 1.1 pour un réseau de période  $\Lambda$ .

$$t(x, y) = \cos\left(\frac{2\pi}{\Lambda}x\right) \cos\left(\frac{2\pi}{\Lambda}y\right) . \quad (1.1)$$

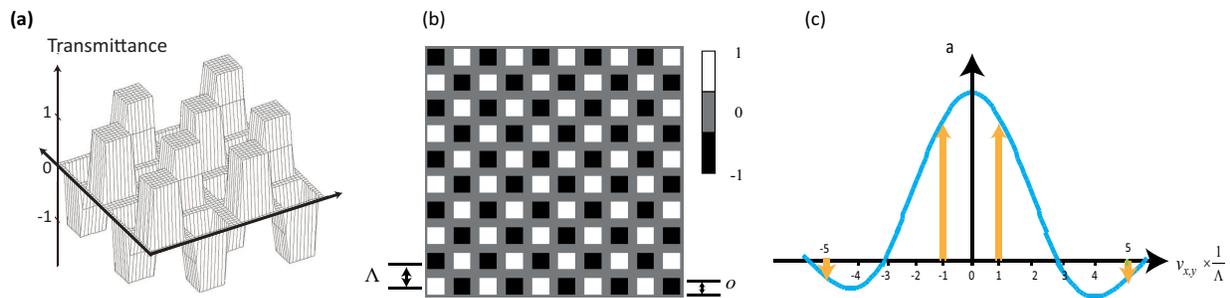


FIGURE 1.10 – (a) Fonction transmittance avec approximation à 3 niveaux (+1; 0; -1), (b) Masque de Hartmann modifié et (c) Amplitude de Fourier de (b) suivant les fréquences  $\nu_x$  et  $\nu_y$ . En vert : ordres diffractés par le masque de Hartmann modifié. En bleu : courbe en sinus cardinal représentant l'amplitude de la transformée de Fourier d'une fonction porte de largeur  $o$ .

La réalisation technique de ce réseau se base sur une approximation à trois niveaux (+1; 0; -1) de la fonction de transmittance. Afin de n'obtenir que les ordres de diffraction d'intérêt, un rapport cyclique particulier  $r = 2/3$  permettant de supprimer les ordres  $3/\Lambda$  et  $-3/\Lambda$  et un réseau de phase pure supprimant, par interférences destructives, tous les ordres pairs dont l'ordre 0 représentant le champ non diffracté par le réseau sont utilisés. Il subsiste néanmoins des ordres supérieurs correspondant aux ordres impairs supérieurs à 3 en valeur absolue mais d'énergie moindre. En effet, environ 90% de l'énergie se retrouve dans les quatre ordres diffractés principaux, ce qui nous permet de considérer que seules quatre répliques sont créés par le MHM et participent à la création de l'interférogramme analysé par la suite.

L'interférogramme créé par le MHM sur le capteur est échantillonné à 4 pixels par période dans chaque direction, comme le montre la Figure 1.12. Une période d'interférogramme fournissant un point de mesure de la phase, l'échantillonnage de la carte de phase se fait sur un carré de 4 x 4 pixels. Étant donné les caméras utilisées (1600 x 1200 avec des pixels carrés de 7,4  $\mu\text{m}$ ). L'échantillonnage transverse de la carte de phase est de 4 x 7,4  $\mu\text{m} = 29,6 \mu\text{m}$ , avec un nombre de points de mesure de 300 x 400 pixels.

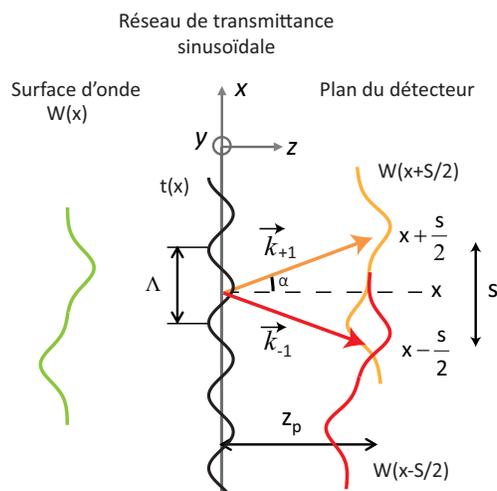


FIGURE 1.11 – Illustration du principe du décalage quadri-latéral pour un modèle à 1 dimension.

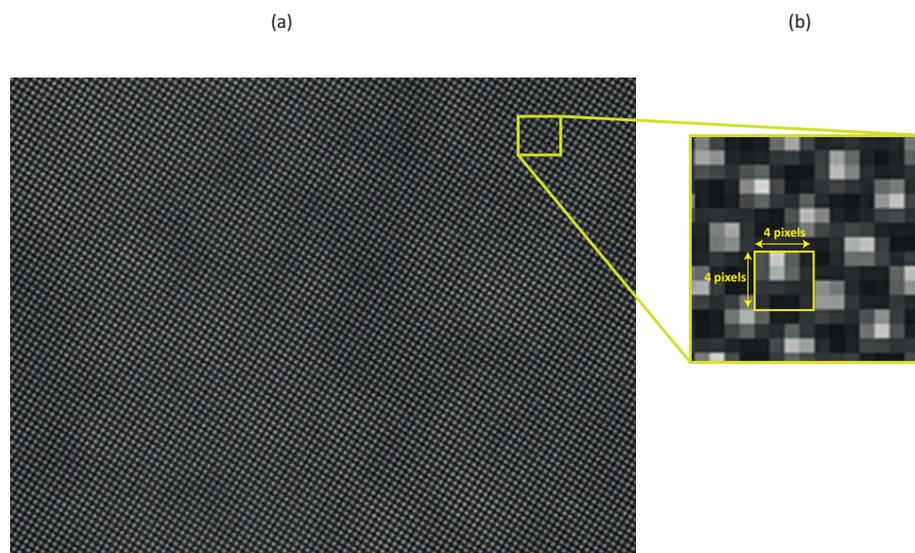


FIGURE 1.12 – (a) Image brute d'un interférogramme obtenu en faisceau collimaté sans échantillon sur l'analyseur de front d'onde, (b) zoom sur une partie de l'interférogramme (a).

### 1.2.4.3 Formation d'un interférogramme

Dans cette partie, nous allons décrire les équations régissant la formation d'un interférogramme en fonction des caractéristiques de l'analyseur à une dimension. Le champ

électrique d'une onde électromagnétique s'écrit :

$$E(x, y) = a(x, y) \cdot \exp(ikW(x, y)) \quad (1.2)$$

avec  $a(x,y)$  l'amplitude du champ  $\mathcal{EM}$ ,  $k$  le nombre d'onde valant  $2\pi/\lambda$  et  $W(x,y)$  la surface d'onde. Cette dernière vaut la différence de chemin optique OPD  $(x,y)$  introduite par l'échantillon à laquelle est additionnée la différence de chemin optique accumulée à la traversée des différents composants optiques.

L'intensité enregistrée dans le plan du détecteur, situé à une distance  $z_p$  du réseau de diffraction est donnée par la relation :

$$I(x) = \frac{1}{2} \times \left[ E\left(x - \frac{s}{2}\right) + E\left(x + \frac{s}{2}\right) \right] \times \left[ E^*\left(x - \frac{s}{2}\right) + E^*\left(x + \frac{s}{2}\right) \right]. \quad (1.3)$$

On remplace l'expression du champ  $E(x,y)$  par son expression (1.2) dans (1.3) :

$$\begin{aligned} I(x) = \frac{1}{2} \times & \left[ a\left(x - \frac{s}{2}\right) \cdot \exp\left(ikW\left(x - \frac{s}{2}\right) + ik_{+1}^{\vec{r}} \cdot \vec{r}\right) \right. \\ & + a\left(x + \frac{s}{2}\right) \cdot \exp\left(ikW\left(x + \frac{s}{2}\right) + ik_{-1}^{\vec{r}} \cdot \vec{r}\right) \left. \right] \times \\ & \left[ a\left(x + \frac{s}{2}\right) \cdot \exp\left(-ikW\left(x + \frac{s}{2}\right) + ik_{-1}^{\vec{r}} \cdot \vec{r}\right) \right. \\ & \left. + a\left(x - \frac{s}{2}\right) \cdot \exp\left(-ikW\left(x - \frac{s}{2}\right) + ik_{+1}^{\vec{r}} \cdot \vec{r}\right) \right]. \quad (1.4) \end{aligned}$$

On développe l'expression précédente,

$$\begin{aligned} I(x) = \frac{1}{2} \times & \left[ a^2\left(x - \frac{s}{2}\right) + a^2\left(x + \frac{s}{2}\right) + a\left(x - \frac{s}{2}\right) \cdot a\left(x + \frac{s}{2}\right) \cdot \right. \\ & \left( \exp\left(ik\left(W\left(x - \frac{s}{2}\right) - W\left(x + \frac{s}{2}\right) + ik_{+1}^{\vec{r}} \cdot \vec{r} - ik_{-1}^{\vec{r}} \cdot \vec{r}\right)\right) + \right. \\ & \left. \left. \exp\left(-ik\left(W\left(x - \frac{s}{2}\right) - W\left(x + \frac{s}{2}\right) + ik_{+1}^{\vec{r}} \cdot \vec{r} - ik_{-1}^{\vec{r}} \cdot \vec{r}\right)\right) \right) \right]. \quad (1.5) \end{aligned}$$

En exprimant les vecteurs  $k_{+1}^{\vec{r}}$  et  $k_{-1}^{\vec{r}}$  définis en fonction de l'angle  $\alpha$  par :

$$k_{+1}^{\vec{r}} = k \begin{pmatrix} \sin(\alpha) \\ \cos(\alpha) \end{pmatrix} \quad \text{et} \quad k_{-1}^{\vec{r}} = k \begin{pmatrix} -\sin(\alpha) \\ \cos(\alpha) \end{pmatrix}, \quad (1.6)$$

on réécrit l'équation 1.5 de la façon suivante :

$$\begin{aligned} I(x) = \frac{1}{2} \times & \left[ a^2\left(x - \frac{s}{2}\right) + a^2\left(x + \frac{s}{2}\right) + a\left(x - \frac{s}{2}\right) \cdot a\left(x + \frac{s}{2}\right) \cdot \right. \\ & \left( \exp\left(ik\left(W\left(x - \frac{s}{2}\right) - W\left(x + \frac{s}{2}\right) + 2ik \cdot \sin(\alpha)x\right) + \right. \right. \\ & \left. \left. \exp\left(-ik\left(W\left(x - \frac{s}{2}\right) - W\left(x + \frac{s}{2}\right)\right) - 2ik \cdot \sin(\alpha)x\right) \right) \right] \quad (1.7) \end{aligned}$$

En utilisant les expressions suivantes :  $I_0 = \frac{1}{2} \times \left( a^2 \left( x - \frac{s}{2} \right) + a^2 \left( x + \frac{s}{2} \right) \right)$   
 et  $I_x(x) = a \left( x - \frac{s}{2} \right) \cdot a \left( x + \frac{s}{2} \right)$ , on réécrit l'expression précédente.

$$I(x) = I_0 + I_x(x) \cdot \cos \left[ k \left( W \left( x - \frac{s}{2} \right) - W \left( x + \frac{s}{2} \right) + 2 \sin(\alpha)x \right) \right] \quad (1.8)$$

En réalisant un développement limité à l'ordre de 1 de la fonction de surface d'onde  $W$  autour de  $x$ , on peut écrire :

$$W(x + \alpha) = W(x) + \alpha \frac{\partial W(x)}{\partial x}. \quad (1.9)$$

En utilisant l'expression précédente, on réécrit l'équation 1.8 :

$$I(x) = I_0 + I_x(x) \cdot \cos \left[ k \left( 2 \sin(\alpha)x - s \frac{\partial W(x)}{\partial x} \right) \right] \quad (1.10)$$

On peut utiliser les notations définies dans la figure 1.11 et la loi des réseaux pour relier l'expression trouvée précédemment aux grandeurs caractéristiques de l'analyseur.

$$I(x) \approx I_0 + I_x(x) \cdot \cos \left[ \frac{2\pi}{pas} \left( x - z_p \frac{\partial W(x)}{\partial x} \right) \right] \quad (1.11)$$

avec  $s = 2z_p \tan(\alpha)$  et  $\sin(\alpha) = \lambda/\Lambda$ .

Il est intéressant de noter que l'équation de formation de l'interférogramme ne fait pas intervenir la longueur d'onde de l'illumination utilisée. Ceci illustre l'achromaticité de l'analyseur qui peut être utilisé avec différents types d'illuminations (LED, lumière polychromatique...).

On voit également que l'on peut, en modifiant la valeur de la distance  $z_p$  réseau/détecteur ajuster la sensibilité du détecteur.

#### 1.2.4.4 Obtention des gradients de la phase

**1.2.4.4.1 Démodulation** Dans le cas d'une onde aberrante comme l'est une onde ayant traversé un échantillon, les franges de l'interférogramme obtenu vont être déformées proportionnellement au chemin optique parcouru.

Une surface d'onde non plane va venir déformer les franges de l'interférogramme : ces déformations peuvent être interprétées comme une modulation fréquentielle autour de la fréquence principale de l'interférogramme  $1/pas$ . La Figure 1.13 illustre cette discussion dans un cas où l'intensité  $a^2$  du faisceau est constante.

La démodulation consiste en la récupération du signal modulant à partir des modifications qu'il a provoquées sur le signal porteur. Dans le cas de l'interférométrie à décalage

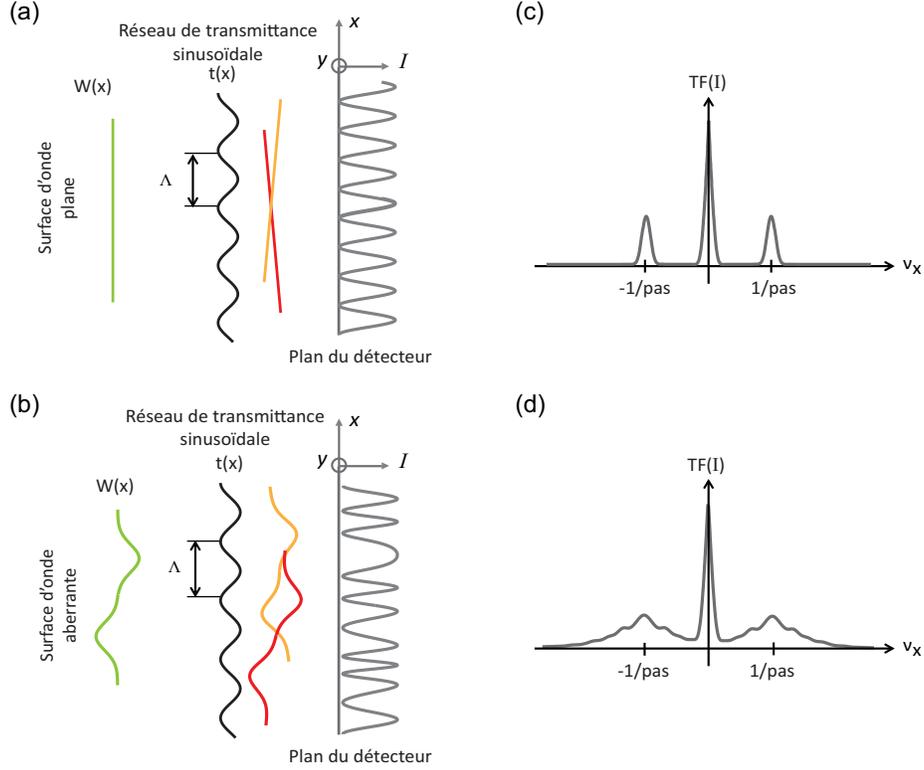


FIGURE 1.13 – (a) Formation d'un interférogramme  $I$  unidimensionnel en présence d'une surface d'onde incidente plane. (b) Formation d'un interférogramme  $I$  unidimensionnel en présence d'une surface d'onde incidente non plane. (c) Transformée de Fourier de  $I$  obtenue en (a). (d) Transformée de Fourier de  $I$  obtenue en (b).

latéral, on effectue ce processus dans l'espace de Fourier et il est possible d'extraire l'intensité et le gradient de la surface d'onde par démodulation autour des fréquence nulle et fréquence  $1/pas$  suivant l'équation :

$$\mathcal{TF}(I) = \mathcal{TF}(I_0) + \delta\left(\frac{1}{pas}\right) \otimes \mathcal{TF}\left[I_x(x) \cdot \cos\left[\frac{2\pi}{pas}\left(x - z_p \frac{\partial W(x)}{\partial x}\right)\right]\right] + C.C \quad (1.12)$$

avec C.C le complexe conjugué.

Le gradient de l'OPD est extrait à partir de l'équation (1.12) et s'exprime sous la forme :

$$\frac{\partial W(x)}{\partial x} = \frac{pas}{2\pi z_p} \cdot \arg\left[I_x(x) \cdot \cos\left[\frac{2\pi}{pas}\left(x - z_p \frac{\partial W(x)}{\partial x}\right)\right]\right] \quad (1.13)$$

avec  $\arg$  la fonction argument.

Par un raisonnement analogue à celui que l'on vient de mener à une dimension, on peut écrire l'équation décrivant la formation de l'interférogramme en deux dimensions :

$$\begin{aligned}
 I(x, y) = & I_0(x, y) + I_x(x, y) \cos \left[ \frac{2\pi}{pas} \left( x - z_p \frac{\partial W}{\partial x}(x, y) \right) \right] \\
 & + I_y(x, y) \cos \left[ \frac{2\pi}{pas} \left( y - z_p \frac{\partial W}{\partial y}(x, y) \right) \right] \\
 & + I_{x+y}(x, y) \cos \left[ \frac{2\pi}{pas} \left( (x + y) - z_p \frac{\partial W}{\partial (x + y)}(x, y) \right) \right] \\
 & + I_{x-y}(x, y) \cos \left[ \frac{2\pi}{pas} \left( (x - y) - z_p \frac{\partial W}{\partial (x - y)}(x, y) \right) \right] ,
 \end{aligned} \tag{1.14}$$

avec :

$$\left\{ \begin{array}{l}
 I_0(x, y) = \frac{a^2 \left( x - \frac{s}{2}, y - \frac{s}{2} \right) + a^2 \left( x - \frac{s}{2}, y + \frac{s}{2} \right) + a^2 \left( x + \frac{s}{2}, y - \frac{s}{2} \right) + a^2 \left( x + \frac{s}{2}, y + \frac{s}{2} \right)}{4} \\
 I_x(x, y) = \frac{a \left( x + \frac{s}{2}, y + \frac{s}{2} \right) a \left( x - \frac{s}{2}, y + \frac{s}{2} \right) + a \left( x + \frac{s}{2}, y - \frac{s}{2} \right) a \left( x - \frac{s}{2}, y - \frac{s}{2} \right)}{2} \\
 I_y(x, y) = \frac{a \left( x - \frac{s}{2}, y - \frac{s}{2} \right) a \left( x - \frac{s}{2}, y + \frac{s}{2} \right) + a \left( x + \frac{s}{2}, y - \frac{s}{2} \right) a \left( x + \frac{s}{2}, y + \frac{s}{2} \right)}{2} \\
 I_{x+y}(x, y) = \frac{a \left( x + \frac{s}{2}, y + \frac{s}{2} \right) a \left( x - \frac{s}{2}, y - \frac{s}{2} \right)}{2} \\
 I_{x-y}(x, y) = \frac{a \left( x + \frac{s}{2}, y - \frac{s}{2} \right) a \left( x - \frac{s}{2}, y + \frac{s}{2} \right)}{2}
 \end{array} \right.$$

L'interférogramme en deux dimensions contient les informations des gradients de la surface d'onde dans les deux directions  $\vec{x}$  et  $\vec{y}$ , ce qui permet de reconstruire la surface d'onde par intégration de ses gradients.

On illustre la méthode d'extraction de l'information d'OPD et d'intensité Figure 1.14. En absence d'échantillon, l'interférogramme est une succession de franges blanches et noires régulières. Dans le cas où un échantillon est imagé, les franges sont déformées localement. Ces déformations permettent de remonter au gradient de l'OPD. L'extraction se fait grâce à un fenêtrage au niveau de certains pics de l'interférogramme dans l'espace fréquentiel. On obtient de cette façon les gradients de l'OPD suivant les deux directions de décalage des répliques du front d'onde. Une intégration bi-dimensionnelle permet dans un second temps de remonter à la valeur d'OPD.

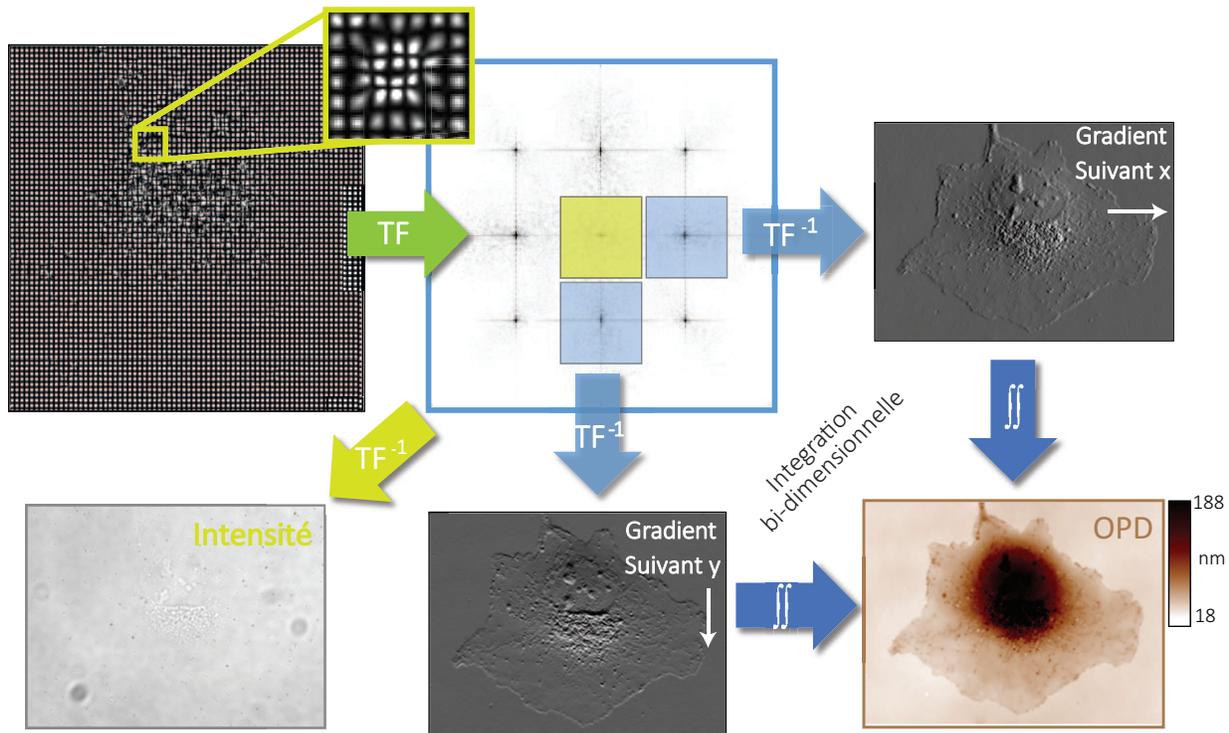


FIGURE 1.14 – Illustration du post-traitement d'un interférogramme pour remonter aux informations d'intensité et d'OPD. Les démodulations s'effectuent par des fenêtrages symbolisés par des carrés colorés autour de certains pics de l'interférogramme. Les symboles TF et TF<sup>-1</sup> signifient respectivement transformée de Fourier et transformée de Fourier inverse.

**1.2.4.4.2 Échantillonnage de l'information sur le détecteur** Il est intéressant d'étudier l'influence de l'échantillonnage du signal sur l'information extraite des interférogrammes.

Dans notre cas, il faut tenir compte de la présence conjointe de l'harmonique central (intensité) et des autres harmoniques (phase) qui doivent être extraits ainsi que de l'échantillonnage de l'interférogramme dû à l'utilisation d'une matrice de détecteurs utilisée pour l'enregistrer.

On sait que pour considérer qu'il n'y a aucune perte d'information, il faut un nombre suffisant de points de mesure. Ainsi, pour qu'un signal soit bien échantillonné, le théorème de Nyquist-Shannon [36] prévoit que son spectre doit être contenu dans l'intervalle  $(\frac{-1}{2p_{éch}}, \frac{1}{2p_{éch}})$  avec  $p_{éch}$  la période d'échantillonnage.

Cela revient à dire que, dans l'espace direct, il y a au moins deux échantillonnages par période de la fréquence maximale présente dans le signal. C'est ce qu'on appelle le critère

de Nyquist, la fréquence maximale échantillonnable étant appelée fréquence de Nyquist.

$$\nu_{éch} < \frac{1}{2 \cdot p_{éch}} \quad (1.15)$$

avec  $\nu_{éch}$  la fréquence d'échantillonnage. Dans le cas d'un détecteur muni de pixels de taille  $T_{pix}$ , la période d'échantillonnage  $p_{éch}$  vaut  $T_{pix}$ .

En raison de l'échantillonnage, le spectre de Fourier du signal est reproduit autour de tous les multiples de la fréquence d'échantillonnage. Ainsi, dans le cas où le critère de

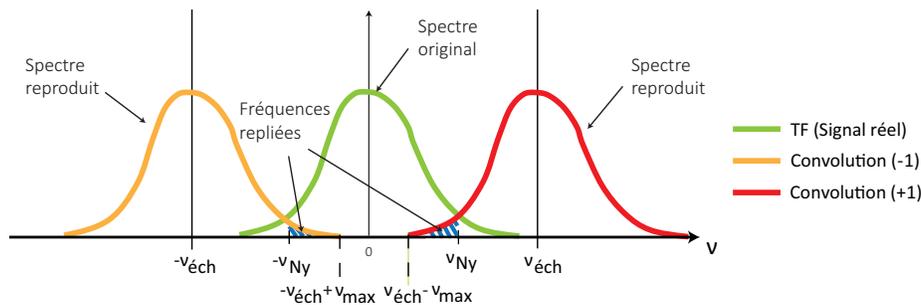


FIGURE 1.15 – Illustration du phénomène de repliement de spectre dans le cas d'un échantillonnage insuffisant pour conserver l'intégrité du signal.

Nyquist-Shannon n'est pas rempli, il y a superposition de spectres et une partie de l'information est brouillée comme le montre la Figure 1.15.

On a montré [33] que dans le cas de l'analyseur de front d'onde, pour l'extraction de l'information des interférogrammes, certaines conditions devaient être réunies pour considérer qu'aucune perte de signal n'était réalisée (les différentes grandeurs sont représentées sur le schéma de la Figure 1.16) :

- La fréquence principale du réseau doit être inférieure à la fréquence de Nyquist afin de pouvoir échantillonner correctement le signal.
- Toutes les fréquences de la bande passante autour de la fréquence principale doivent respecter le critère de Nyquist.

Ces deux conditions sont nécessaires pour considérer qu'il n'y a pas de perte de signal.

- Le spectre des fréquences du signal modulé doit être intégralement contenu dans la bande passante.

L'information utile est extraite à l'aide d'une fenêtre dont les dimensions doivent correspondre exactement à la portion de l'interférogramme contenant l'information de gradient de l'OPD.

- Il ne doit pas y avoir de recouvrement entre l'information d'intensité et l'information de la phase modulée.

Les pics d'intensité et de gradient de l'OPD doivent être suffisamment séparés afin qu'il n'y ait pas de recouvrement qui viendrait fausser l'information extraite.

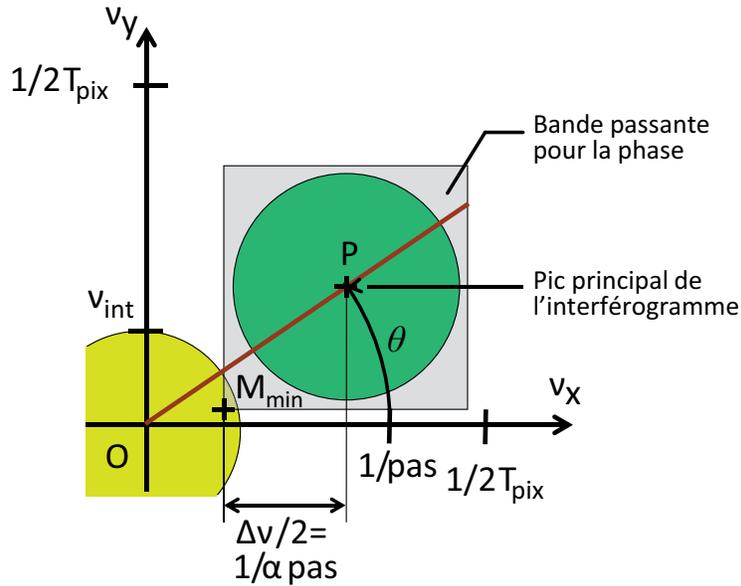


FIGURE 1.16 – Schéma illustrant les notations permettant de décrire l'espace de Fourier d'un interférogramme obtenu par interférométrie à décalage. Le rectangle gris représente la bande passante nécessaire pour le fenêtrage de l'information utile de la phase modulée, le rond vert correspond à l'information utile, le rond jaune correspond à l'information utile pour le pic central correspondant à l'intensité. Le point  $M_{\min}$  est le coin inférieur gauche de la fenêtre de bande passante et  $\theta$  est l'orientation du réseau.

Il s'agit également d'échantillonner correctement les signaux sur le détecteur. Dans le cas de la microscopie, on sait que les fréquences de l'objet imagé sont limitées par l'ouverture numérique de l'objectif. On verra ce phénomène plus en détail dans le chapitre 4. On peut relier les fréquences accessibles à l'ouverture numérique de l'objectif :

$$n \cdot \sin(\Theta_d) = \lambda/p. \quad (1.16)$$

La limite de résolution de l'objectif est alors définie comme étant la plus petite période résolue.

Dans le cas d'un système introduisant un grandissement  $\gamma$  de l'objet imagé, on peut relier les résolutions dans les espaces objet  $p_{objet}$  et image  $p_{image}$  du microscope comme suit :

$$p_{image} = p_{objet} \times \gamma. \quad (1.17)$$

Ainsi, le spectre fréquentiel en l'intensité dans le plan image du microscope est limité par les fréquences transmises par l'objectif. Il a été montré précédemment [33] qu'il existe deux conditions impliquant les caractéristiques des objectifs utilisés afin de ne pas perdre d'information sur l'objet imagé. La courbe de la Figure 1.17 a pu être tracée et sera utilisée

pour évaluer les conditions expérimentales pour chaque expérience réalisée dans la suite de ce manuscrit. Un objet transparent peut être considéré comme un quasi-objet de phase. C'est à dire que l'énergie à hautes fréquences de l'intensité est faible devant celle de l'OPD aux mêmes fréquences. On va ainsi pouvoir négliger l'intensité. C'est ce que l'on appelle "cas où l'intensité est négligée" sur la Figure 1.17.

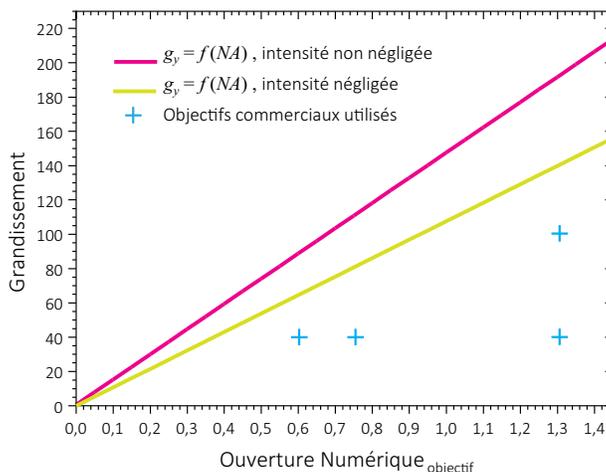


FIGURE 1.17 – Représentation graphique du grandissement nécessaire pour échantillonner correctement le signal dans le cas d'un détecteur tel que  $T_{pix}=29,6 \mu\text{m}$  et  $\lambda = 0,55 \mu\text{m}$ , dans le cas d'un contenu fréquentiel de l'intensité négligé (courbe orange) ou non (courbe verte). Les objectifs utilisés dans les travaux suivants sont représentés par des croix bleues au sein du graphique.

#### 1.2.4.5 Prise de référence

En microscopie, l'imagerie est réalisée grâce à un système optique qui n'est pas parfait et qui, par conséquent va introduire des aberrations. La principale aberration vient de la non-télécentricité de l'objectif et de la lentille de tube qui ne sont pas toujours confocaux. En effet, les optiques permettant l'imagerie d'un échantillon (principalement lentilles et objectif) vont déformer le front d'onde mesuré par l'analyseur au même titre que l'échantillon. En général, le signal qui nous intéresse (*i.e.* l'OPD dû à l'échantillon) est d'une amplitude bien inférieure.

Ainsi, nous avons accès aux gradients de la surface d'onde définis comme la somme des gradients de la différence de chemin optique introduite par un échantillon placé sur le microscope, et des gradients de la différence de chemin optique introduite par les optiques du microscope par rapport à une surface d'onde plane. Il est donc obligatoire de retirer la contribution des optiques traversées au gradient de la surface d'onde pour obtenir une mesure de la grandeur qui nous intéresse.

La méthode utilisée dans les expériences présentées dans la suite de ce manuscrit, et permettant de supprimer la contribution des optiques du microscope, est d'effectuer ce que l'on appelle une *prise de référence* au début d'une expérience. Cela consiste à retirer l'objet ou à se placer sur une zone de l'échantillon dépourvue d'objet et à enregistrer un interférogramme dit *de référence*. Cette étape est d'ailleurs commune à d'autres techniques de phase quantitative [37, 38, 39, 40].

Par démodulations successives autour de la fréquence nulle et des fréquences principales de l'interférogramme, on obtient une mesure des grandeurs suivantes :

$$\begin{cases} I_0^{référence}(x, y) \\ \frac{2\pi}{pas} z_p \frac{\partial OPD_{microscope}}{\partial x}(x, y) \\ \frac{2\pi}{pas} z_p \frac{\partial OPD_{microscope}}{\partial y}(x, y) \end{cases}, \quad (1.18)$$

avec  $OPD_{microscope}$  la différence de chemin optique introduite par les optiques du microscope, et  $i_0^{ref}$  l'intensité moyenne, définie dans l'équation 1.14, en l'absence d'objet.

Considérons maintenant l'acquisition d'un interférogramme en présence d'un objet, nous avons accès par démodulation de l'interférogramme aux mesures suivantes :

$$\begin{cases} I_0^{obj}(x, y) \\ \frac{2\pi}{pas} z_p \left[ \frac{\partial OPD_{microscope}}{\partial x}(x, y) + \frac{\partial OPD_{échantillon}}{\partial x}(x, y) \right] \\ \frac{2\pi}{pas} z_p \left[ \frac{\partial OPD_{microscope}}{\partial y}(x, y) + \frac{\partial OPD_{échantillon}}{\partial y}(x, y) \right] \end{cases}, \quad (1.19)$$

avec  $OPD_{échantillon}$  la différence de chemin optique introduite par l'échantillon, et  $I_0^{obj}$  l'intensité moyenne, définie dans l'équation 1.14, en présence de l'objet.

En combinant terme à terme le système d'équations 1.19 et le système 1.18, on obtient :

$$\left\{ \begin{array}{l}
 I(x, y) \approx \frac{I_0^{obj}}{I_0^{ref}}(x, y) \\
 OPD_x(x, y) = \frac{2\pi}{pas} z_p \left[ \frac{\partial OPD_{microscope}}{\partial x}(x, y) + \frac{\partial OPD_{\acute{e}chantillon}}{\partial x}(x, y) \right] - \frac{2\pi}{pas} z_p \frac{\partial OPD_{microscope}}{\partial x}(x, y) \\
 \quad = \frac{2\pi}{pas} z_p \frac{\partial OPD_{\acute{e}chantillon}}{\partial x}(x, y) \\
 OPD_y(x, y) = \frac{2\pi}{pas} z_p \left[ \frac{\partial OPD_{microscope}}{\partial y}(x, y) + \frac{\partial OPD_{\acute{e}chantillon}}{\partial y}(x, y) \right] - \frac{2\pi}{pas} z_p \frac{\partial OPD_{microscope}}{\partial y}(x, y) \\
 \quad = \frac{2\pi}{pas} z_p \frac{\partial OPD_{\acute{e}chantillon}}{\partial y}(x, y)
 \end{array} \right. , \tag{1.20}$$

avec  $I(x, y)$  la modification de l'intensité d'illumination par l'objet.

Nous avons donc accès à l'intensité et aux gradients de la différence de chemin optique introduit par l'échantillon : nous pouvons intégrer numériquement ces gradients pour remonter à la différence de chemin optique.

#### 1.2.4.6 Montage expérimental

La solution technique utilisée dans la suite de ce manuscrit est un analyseur de front d'onde commercialisé par l'entreprise *Phasics* (Palaiseau, France). La Figure 1.18 représente un schéma en coupe simplifié du détecteur et un schéma du montage optique. L'atout majeur de l'analyseur est de pouvoir se placer au niveau du plan image d'un microscope grâce à une bague d'adaptation au niveau d'un port de sortie. Le montage est en configuration *common path* : le bras de mesure et de référence sont confondus. L'intensité et l'OPD sont mesurées simultanément, ceci résulte en une perte de points de mesure par rapport au nombre de pixels du détecteur. Le détecteur possède 1200 x 1600 pixels et les images d'intensité et d'OPD possèdent 300 x 400 points de mesure.

#### 1.2.5 Conclusion

Au cours de cette seconde partie concernant les techniques de phase quantitative, je me suis efforcée de présenter différentes techniques de microscopie plein champ permettant de remonter au déphasage introduit par un échantillon.

Les techniques présentées ont été choisies en raison de critères qui nous semblaient importants pour leur implémentation et leur utilisation pour des applications comme celles que nous avons développées.

Le tableau 1.1 résume les caractéristiques de chacune des techniques évoquées dans ce chapitre. L'atout de ces techniques est la quantification sans marquage de l'échantillon, c'est-à-dire sans modification d'une grandeur appelée différence de chemin optique et reliée directement à l'indice de réfraction. On verra que l'on peut directement relier cette

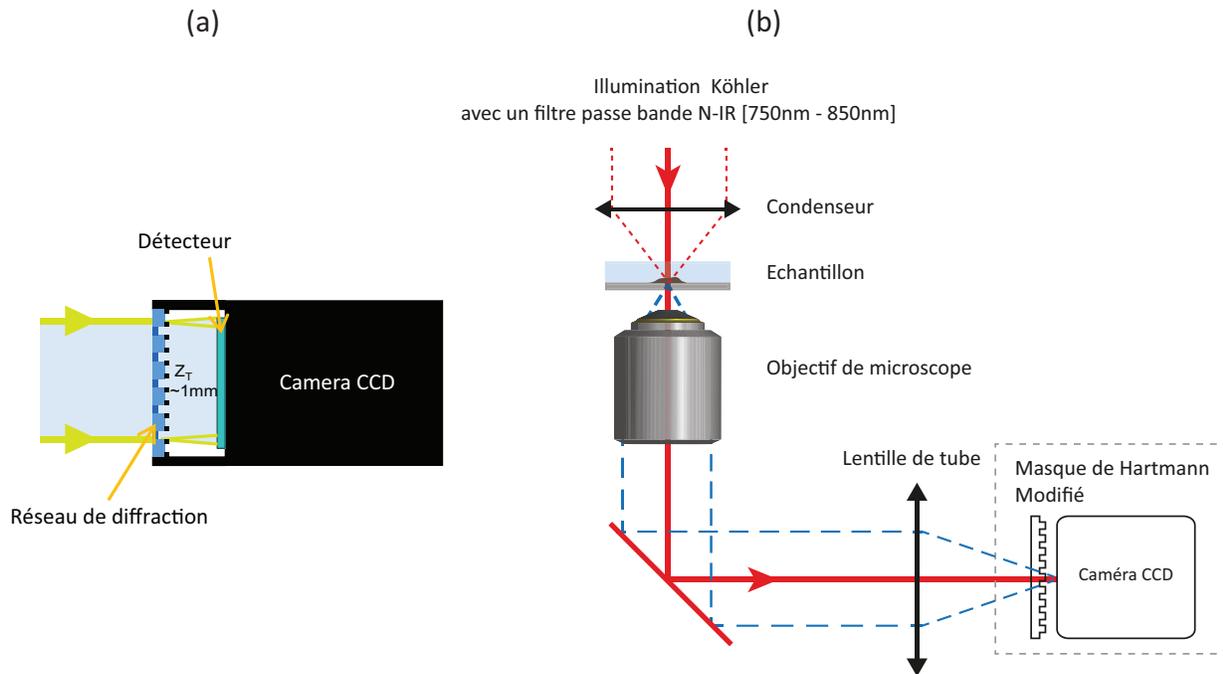


FIGURE 1.18 – (a) Schéma en coupe de l'appareil suivant l'axe optique. (b) Schéma représentant le montage optique.

différence de chemin optique à des grandeurs d'intérêt biologique telles que la masse sèche de cellules, ou encore tracer des cartes de biréfringence ou d'indice de réfraction nous permettant de caractériser les différents constituants d'un échantillon.

Technique	Common/ Double path	Points de mesure = pixels détecteur ?	1 mesure en 1 image ?
Diffraction sur un réseau	common path	Non	Oui
Diffraction sur un réseau (lum.bl.)	common path	Oui	Oui
Holographie sur l'axe	double path	Oui	Non
Holographie hors axe	double path	Non	Oui
FPM	common path	Oui	Oui
Spirale de phase	common path	Oui	Non
Speckle	double path	Oui	Oui
Interféromètre $\tau$	common path	Oui	Oui ou Non
IDQL	common path	Non	Oui

Technique	Cohérence Spatiale nécessaire ?	Cohérence temporelle nécessaire ?	Résolution
Diffraction sur un réseau	Oui	Oui	0,15 nm [24]
Diffraction sur un réseau (lum.bl.)	Oui	Non	0,3 nm [25]
Holographie sur l'axe	Oui	Oui	5 nm [9]
Holographie hors axe	Oui	Oui	5 nm [10]
FPM	Non	Oui	0,7 nm [27]
Spirale de phase	Oui	Oui	$\approx$ 10 nm [29]
Speckle	Oui	Non	1,3 nm [17]
Interféromètre $\tau$	Oui	Oui ou Non	0,42 nm [26]
IDQL	Non	Non	0,38 nm

Tableau 1.1 – Tableau récapitulatif des caractéristiques des techniques de phase quantitative présentées.

---

### Mesure et quantification d'échantillons fins

---

Nous venons de décrire la technique de phase quantitative utilisée dans ces travaux. Ce second chapitre est consacré aux mesures qui peuvent être réalisées sur des échantillons fins afin d'envisager une application à des cellules épithéliales.

L'objet de ce chapitre est de démontrer les performances et l'apport de la mesure dans le cadre de la comparaison et de la classification de populations cellulaires.

#### 2.1 Contexte

L'apport de l'imagerie de phase en microscopie dans le cadre de l'étude d'échantillons semi-transparents a maintenant été largement démontré, notamment en raison du contraste apporté. En effet, les objets biologiques, comme les cellules ou les tissus, sont très peu contrastés, et donc peu visibles en imagerie d'intensité et peuvent être considérés comme des objets de phase. En microscopie, le contraste est un élément important qui permet la visualisation et l'identification de constituants à l'intérieur d'un échantillon. Au delà du contraste, l'imagerie de phase quantitative possède un atout supplémentaire qui est de permettre une quantification de la différence de chemin optique introduite par l'échantillon, quantité que l'on pourra relier à des grandeurs d'intérêt biologique.

Dans cette partie, nous allons présenter l'approximation dite "projective", introduite par Pierre Bon dans le cadre de l'IDQL dans ses travaux de thèse [33] qui nous permet d'interpréter les images de phase obtenues dans un régime d'illumination particulier qu'est l'illumination spatialement cohérente (i.e. illumination par une onde plane). On considérera dans ce cadre que la différence de chemin optique mesurée est le résultat de l'intégration du retard accumulé par l'onde après la traversée de tout l'échantillon (voir Figure 2.1).

On peut faire une analogie avec l'imagerie à rayons X qui suppose l'accumulation de l'ab-

sorption sur toute l'épaisseur des structures imagées.

Tout objet observé en microscopie peut être décrit par son indice de réfraction  $n(x,y)$  qui est composé d'une partie imaginaire et d'une partie réelle :  $n(x,y) = n_{\text{réel}}(x,y) + i n_{\text{imaginaire}}(x,y)$ . La partie réelle traduit un phénomène de déphasage tandis que la partie imaginaire traduit un phénomène d'absorption du champ électromagnétique incident.

Avec l'imagerie à rayons X, on réalise une imagerie grâce à la partie imaginaire de l'indice de réfraction. Dans le cadre de notre mesure, c'est l'accumulation d'une différence de chemin optique sur toute l'épaisseur de l'échantillon qui permettra l'imagerie, cette fois grâce à la partie réelle de l'indice de réfraction.

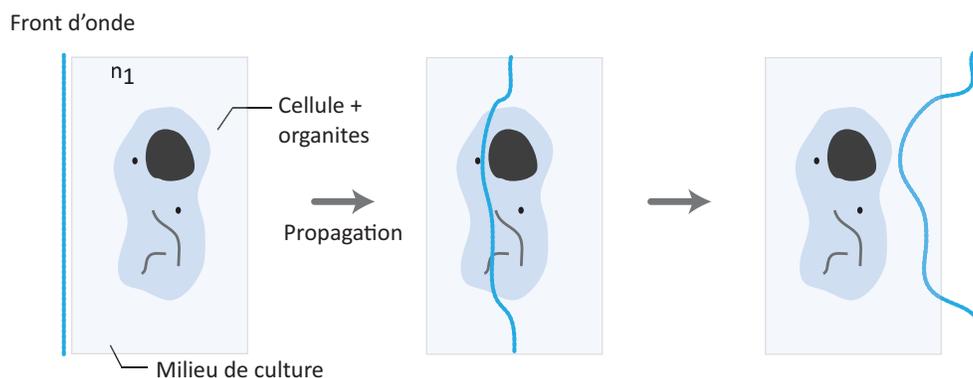


FIGURE 2.1 – Illustration du principe de la mesure en projectif. Le front d'onde se déforme de plus en plus à mesure que la lumière se propage au sein de l'échantillon. La différence de chemin optique mesurée est le résultat de l'accumulation d'un retard de phase sur toute l'épaisseur de l'objet imagé en raison de sa différence d'indice avec le milieu extérieur.

Dans le cadre de ces travaux de thèse, cette approximation nous permet d'interpréter les images de différence de chemin optique obtenues et d'en extraire des données quantitatives en vue d'applications biologiques. Dans la suite, on démontrera la pertinence des applications développées et leur caractérisation du point de vue métrologique sera réalisée.

## 2.2 Mesure d'une différence de chemin optique en mode projectif

### 2.2.1 Principe de l'approche et hypothèses réalisées

Avec cette approximation, plusieurs hypothèses sont réalisées. Au niveau de l'imagerie, on néglige la notion de plan de mise au point et de filtrage du microscope. On considèrera que quelque soit le plan imagé de l'échantillon, la mesure sera identique. Aussi, le filtrage fréquentiel réalisé par le système optique en raison de la dimension finie des optiques utilisées est également négligé dans un premier temps.

Sont également négligées la diffraction et la réfraction. On suppose alors que la différence d'indice entre l'échantillon et le milieu environnant au sein duquel il est imagé est faible, ce qui est très souvent le cas pour des échantillons biologiques majoritairement constitués d'eau et imagés dans un milieu aqueux afin de préserver l'équilibre osmotique entre l'objet et son milieu environnant. Cela suppose que la lumière se propage sans changement de direction au sein de l'échantillon.

Dans ce régime projectif, on considère que l'objet est éclairé par une onde plane et que la direction de propagation de cette onde se fait selon l'axe optique du système. Techniquement, cet éclairage peut être réalisé en microscopie grâce à une illumination dite *de Köhler* en fermant le diaphragme d'ouverture au maximum. La richesse angulaire de l'illumination est alors faible et on peut considérer que l'illumination est spatialement cohérente. On a montré [41] que la grandeur mesurée dans le cadre de cette approximation est une différence de chemin optique introduite par l'échantillon qui peut être reliée à une épaisseur mécanique et à une différence d'indices de réfraction suivant la relation :

$$OPD_{\text{projectif}}(x, y) = \int_0^e (n(x, y) - n_{\text{milieu}}) \cdot dz \quad (2.1)$$

avec  $n(x, y)$  indice de réfraction local de l'échantillon,  $n_{\text{milieu}}$  indice de réfraction du milieu environnant et  $e$  l'épaisseur mécanique.

On peut définir une condition de validité de la mesure qui impose que les détails observés de l'échantillon devront être bien supérieurs à la limite de diffraction du système d'imagerie utilisé.

On voit qu'avec une mesure d'OPD, en connaissant la différence d'indice entre l'échantillon et le milieu, on peut remonter à une valeur d'épaisseur physique et qu'en ayant une connaissance de l'épaisseur physique, on peut remonter à une valeur d'indice de réfraction grâce à la relation (2.1). On peut déjà noter une des limitations majeure de l'approximation utilisée : à partir d'une mesure de différence de chemin optique, il est impossible de décorréler l'indice optique de l'épaisseur. C'est pourquoi on étudiera par la suite dans le Chapitre 4 une modification du système expérimental afin de permettre une mesure décorrélée de ces deux grandeurs en utilisant la notion de sectionnement optique de l'échantillon.

## 2.2.2 Caractérisation de la mesure

Ainsi que nous l'avons déjà expliqué dans la partie introductive de ce manuscrit, il existe une dispersion statistique de la mesure qui se traduit par un bruit sur les images et par une incertitude sur les valeurs mesurées. Ce bruit, de même qu'il va entacher d'erreur la mesure, va également diminuer sa résolution. Il est important de pouvoir définir sa nature et de l'évaluer durant tout le processus de mesure pour évaluer la justesse et la fiabilité de

la mesure finale.

### 2.2.2.1 Démarche métrologique

La démarche métrologique appliquée à la caractérisation des différentes applications présentées dans ce manuscrit sera la suivante :

- Définition du mesurande, qui représente la grandeur que l'on veut mesurer
- Définition claire du domaine d'application (domaine de longueur d'onde, dimensions de l'échantillon...). Pour cela, on utilisera des développements théoriques que viendront confirmer des outils de simulation et des expériences afin d'évaluer les approximations qui seront réalisées.
- Établissement d'une procédure de la méthode de mesure
- Quantification des performances de la mesure. Ces grandeurs vont servir à caractériser la mesure.
  - L'exactitude est plus aisée à définir par l'erreur de mesure. Elle s'exprime en unité de grandeur (erreur absolue) ou en pourcentage (erreur relative) dans le cas où une comparaison avec une valeur tabulée ou théorique est possible,
  - La répétabilité correspond à la fidélité sous des conditions où des résultats d'essais indépendants sont obtenus par la même méthode sur un même échantillon, par le même opérateur,
  - La reproductibilité qui correspond à la dispersion des mesures quand on a fait varier les facteurs pouvant influencer sur la mesure,.
  - La justesse correspondant à l'étroitesse de l'accord entre la moyenne d'un nombre infini de valeurs mesurées répétées et une valeur théorique ou de référence,
  - La fidélité qui est l'aptitude d'un appareil de mesure à donner des mesures exemptes d'erreurs accidentelles. La fidélité (ou précision) définit la dispersion des résultats. La fidélité correspond à la somme des termes {répétabilité + reproductibilité},
  - La sensibilité, qui est un paramètre exprimant la variation du signal de sortie d'un appareil de mesure en fonction de la variation du signal d'entrée.
  - La limite de détection qui représente la résolution d'un appareil est la plus petite variation de la grandeur mesurée qui produit une variation perceptible de l'indication délivrée par l'instrument,
  - La limite de quantification qui est la plus petite valeur du signal qui permet de réaliser une quantification,
- Quantification finale de l'incertitude de mesure

### 2.2.2.2 Limite de quantification-Résolution de la mesure

Dans un premier temps, on cherche à quantifier la résolution de la mesure d'OPD, c'est à dire la plus petite valeur de différence de chemin optique mesurable. Pour cela, il faut

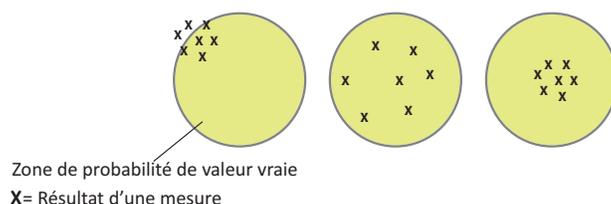


FIGURE 2.2 – Schéma illustrant les termes fidélité, justesse et exactitude issus du vocabulaire de la métrologie. Dans le premier cas, les mesures sont proches les unes des autres (bonne fidélité) mais en dehors de la zone de probabilité de la valeur vraie (mauvaise justesse). Dans le deuxième cas, les mesures sont dans la zone où se trouve la valeur vraie et le "barycentre" des points est au centre de la zone rouge (bonne justesse) mais les mesures sont dispersés entre elles (mauvaise fidélité). Enfin, le dernier cas présente des mesures justes et fidèles.

quantifier la valeur du bruit sur l'image qui est enregistrée. En effet, c'est le niveau de bruit qui est limitant ici.

Dans le cadre d'une mesure classique, une référence est prise dans une zone vide de l'échantillon afin de prendre en compte la composante statique de l'OPD (voir partie 1.2.4.5 du manuscrit). Il faut donc également regarder l'influence de cette prise de référence sur le bruit de mesure et notamment du nombre d'images moyennées pour réaliser cette référence.

On effectue la mesure sur une lamelle seule prise comme échantillon. Les seules fluctuations spatiales visualisées seront les fluctuations de la mesure.

On distinguera les fluctuations d'ordre spatial, caractérisées par le fait que les différents pixels de l'image ont une valeur différente les uns des autres pour une image prise à un instant  $t$ , des fluctuations d'ordre temporel caractérisées par le fait qu'un même pixel considéré sur des images prises à des temps différents aura une valeur différente.

Les images de différence de chemin optique (300x400 pixels) sont prises dans une région identique de la lamelle et sont moyennées de 1 à 100 fois. On mesure l'écart-type spatial, noté  $\sigma$ , de la valeur des pixels de l'image et on étudie son évolution en fonction du nombre d'images moyennées. Les résultats sont présentés dans la Figure 2.3.

On étudie deux cas : le premier cas correspond à une situation où les interférogrammes *image* et *référence* sont moyennés de façon similaire. Le second cas représente le cas réel expérimental où l'interférogramme *référence* est moyenné 30 fois et l'interférogramme *image* est moyenné de 1 à 100 fois.

On peut voir que l'écart type de la valeur de différence de chemin optique, c'est-à-dire ses fluctuations, évolue avec le nombre d'images moyennées et ce, de façon similaire pour les deux cas. Plus on moyenne d'images et plus l'écart-type spatial de la valeur des pixels diminue conformément à ce qui était attendu. En imagerie, le moyennage d'acquisitions est souvent utilisé pour augmenter le rapport signal sur bruit (RSB).

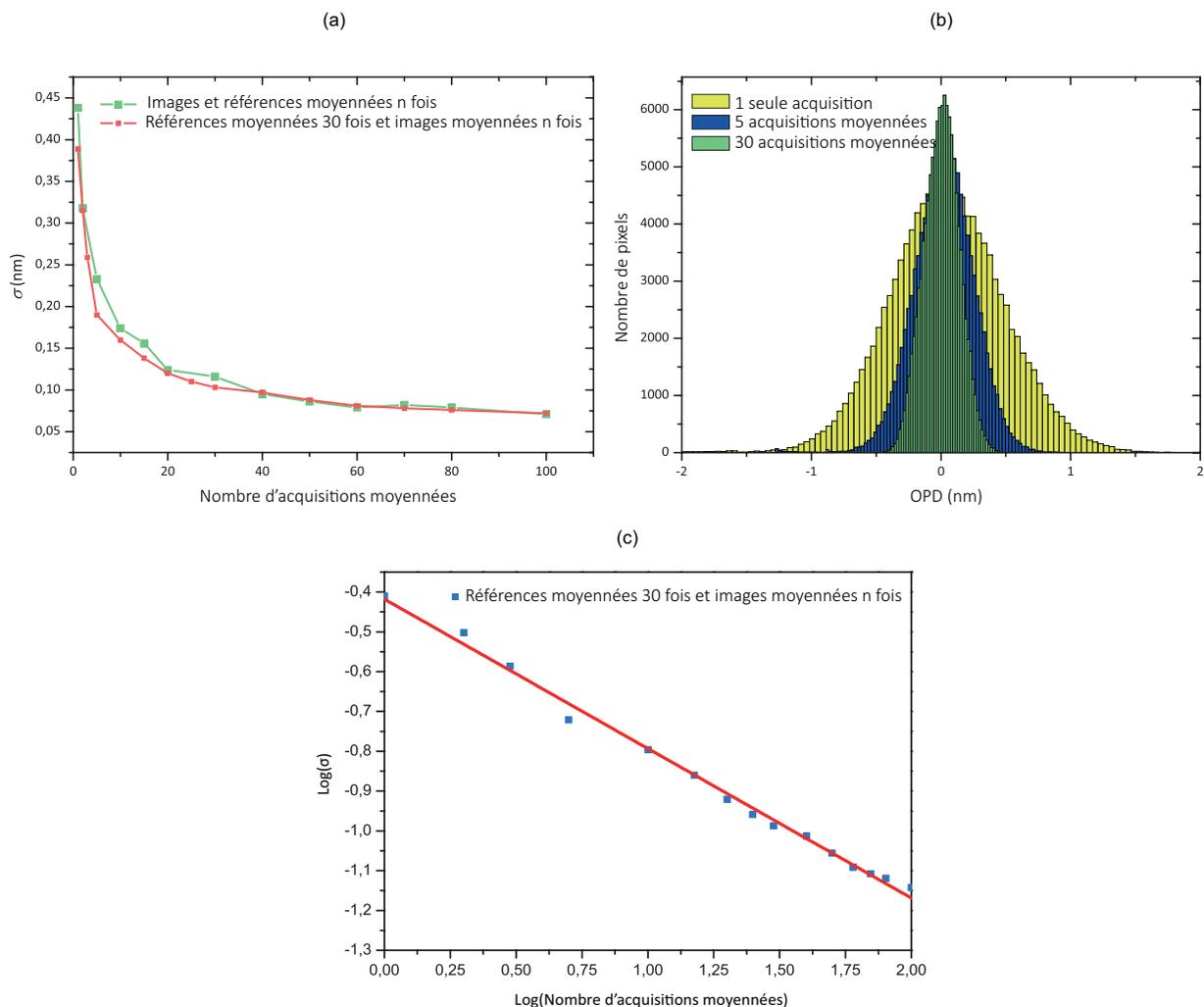


FIGURE 2.3 – (a) Ecart type spatial des valeurs d'OPD en fonction du moyennage des acquisitions réalisé, (b) Histogramme des valeurs d'OPD en fonction du moyennage des acquisitions réalisé et (c) évolution de l'écart type des pixels en fonction du nombre d'acquisitions moyennées en échelle log-log. Observation avec un objectif à air de grandissement  $40\times$  et d'ouverture numérique  $ON=0,75$  d'une zone vide de l'échantillon de  $300\times 400$  pixels.

L'écart-type des valeurs d'OPD de l'image sans moyennage de l'acquisition vaut 0,38 nm et définit la résolution de notre technique. En effet, en deçà de cette valeur, le signal est noyé dans le bruit.

Dans le cas où l'on doit réduire le niveau de bruit (si l'objet est fin ou que le choc d'indice est très faible entre l'élément et le milieu environnant), on voit qu'en moyennant des images on peut augmenter la résolution en terme de différence de chemin optique jusqu'à atteindre 0,07 nm pour 100 images moyennées.

L'évolution de l'écart-type se révèle être en fonction de l'inverse de la racine carrée du

nombre de moyennes, ce qui peut être mis en évidence en utilisant une représentation en échelle log-log (voir Figure 2.3(c)). On peut effectuer une régression linéaire des données dont le coefficient de détermination  $R^2$  vaut plus de 0,99.

Plus on moyenne d'images et plus l'amplitude des fluctuations diminue et tend vers une asymptote horizontale qui correspond à un niveau de bruit minimal en deçà duquel on ne pourra jamais aller.

On ne gagne plus en diminution de bruit et l'acquisition est de plus en plus longue, il paraît raisonnable de trouver un compromis entre durée d'acquisition et gain en RSB et se limiter à 30 images moyennées.

En ce qui concerne la référence réalisée, on voit que jusqu'à 30 images moyennées, on a un gain par rapport à un cas où la référence est moyennée sur moins d'images, ce qui justifie la moyenne de 30 images réalisée de façon systématique pour les expériences.

En effet, la référence, au même titre que l'image, contient du bruit qui s'ajoute à celui de la mesure. En moyennant la référence, on peut réduire ce bruit. On justifie ainsi le fait de prendre systématiquement une référence moyennée sur 30 interférogrammes.

### 2.2.2.3 Performances de la mesure

On utilise un échantillon calibré de silice fondue d'indice de réfraction parfaitement connu ( $n_{\text{verre}} = 1,455$ ) à la longueur d'onde  $\lambda = 700$  nm, gravé suivant un motif de plots carrés périodiques de période  $10,88 \mu\text{m}$ . Cet échantillon a été réalisé par usinage chimique par Jean-Claude Pommier (Laboratoire Hubert Curien, Saint Etienne). La profondeur de gravure, mesurée par AFM [42] (*AFM* pour *Atomic force Microscope*) sur un champ de quelques plots est de  $185 \pm 7$  nm, les 7 nm correspondant à la dispersion constatée par la mesure AFM. La figure 2.4 montre la carte AFM obtenue par l'équipe de Saint Etienne.

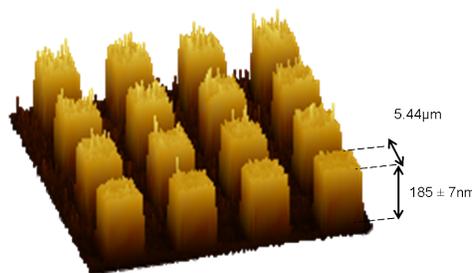


FIGURE 2.4 – Mesure par AFM d'un échantillon de silice fondue gravé d'un motif périodique, de période  $10,88 \mu\text{m}$  de profondeur de gravure  $185 \pm 7$  nm.

L'observation de cet échantillon est réalisée en transmission avec un objectif de grandissement  $40\times$ ,  $ON=1,3$  et un grandissement supplémentaire de  $2\times$  pour optimiser l'échantillonnage sur le détecteur.

Champ de mesure	OPD (nm)
1	84,3 ± 3,7
2	86,9 ± 2,5
3	86,0 ± 3,0
4	84,9 ± 3,0
Moyenne	85,5
Médiane	85,5
Écart-type	1,2

Tableau 2.1 – Résultats obtenus de la mesure de l'échantillon de silice fondue. Observation au grandissement 80×.

Pour un échantillonnage optimal des images, il y a deux conditions à remplir :

- optimiser la résolution du système d'imagerie afin de pouvoir imager l'objet,
- échantillonner correctement les objets observés sur le détecteur.

La différence de chemin optique attendue en considérant une épaisseur de  $185 \pm 7$  nm avec une approche projective est calculée à partir de la relation :

$$OPD_{\text{projectif}} = (n_{\text{plots}} - n_{\text{milieu d'immersion}}) \times h \quad (2.2)$$

avec  $n_{\text{plots}} = n_{\text{verre}} = 1,455$ ,  $n_{\text{milieu d'immersion}} = n_{\text{air}} = 1$  à  $\lambda = 700$  nm et  $h$ , la hauteur des plots valant  $185 \pm 7$  nm. On trouve une valeur d'OPD de  $84,2 \pm 3,2$  nm.

Comparons cette valeur à celle trouvée expérimentalement.

On prend une image de l'échantillon dans ces conditions d'éclairage afin de vérifier l'exactitude de la mesure. Pour déterminer la valeur d'OPD des plots de l'échantillon, on peut tracer un profil sur l'image suivant un de ces plots et en déterminer le déphasage. Pour obtenir une mesure plus représentative de l'échantillon, on choisit de moyenner cette mesure sur plusieurs plots (une centaine environ).

Quatre champs différents de l'échantillon sont imagés. On réalise un histogramme des valeurs de pixels de chaque image afin de séparer l'information des plots de celle de la partie non gravée du substrat. On obtient une figure avec deux pics majoritaires, le premier correspondant à la partie non gravée et le second aux différents plots. On calcule ensuite la valeur d'OPD des plots gravés, ce qui correspond à la différence d'OPD entre ces deux pics. La largeur des pics est utilisée et définit l'écart type de la mesure d'OPD. On calcule la valeur moyenne et médiane de l'OPD mesurée sur les 4 champs et l'écart type de la valeur moyenne de l'OPD. Les résultats de la mesure sont présentés Figure 2.5 et dans le Tableau 2.1

On voit que les valeurs d'OPD mesurées se situent toutes dans l'intervalle donné à la suite de la détermination de l'épaisseur mécanique de l'objet par AFM, on rappelle que la

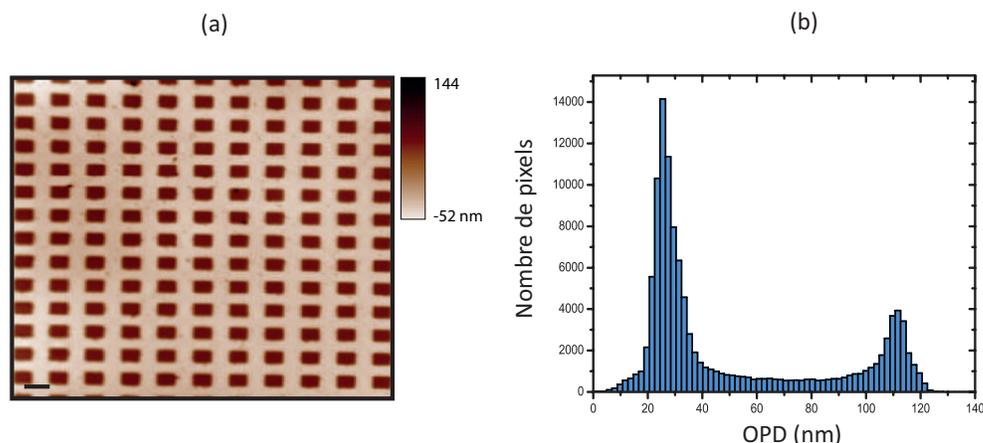


FIGURE 2.5 – (a) Image d’OPD de l’échantillon de silice fondue gravé d’un motif périodique de période  $10,88\mu\text{m}$  de profondeur de gravure  $185 \pm 7 \text{ nm}$ . (b) Histogramme de l’image d’OPD présentée en (a). Observation avec un grandissement total de  $80\times$ ,  $\text{ON}=1,3$ . Échelle =  $10 \mu\text{m}$ .

mesure a donné une valeur de  $84,2 \pm 3,2 \text{ nm}$ .

On peut caractériser maintenant l’exactitude de la mesure. On trouve une valeur moyenne de  $85,5 \text{ nm}$  avec un écart-type de  $1,2 \text{ nm}$ . En comparant cette valeur moyenne à la valeur moyenne déterminée par AFM, on peut calculer l’écart de la mesure à la valeur donnée par AFM qui est de  $1,3 \text{ nm}$ , ce qui correspond à  $1,5\%$  d’écart relative. La fidélité de la mesure, caractérisée par sa dispersion moyenne, est de  $1,2 \text{ nm}$ , ce qui nous permet de conclure à l’exactitude de la mesure d’OPD réalisée.

On évalue la répétabilité de la mesure d’OPD sur ce même échantillon. 5 images d’OPD sont prises à la suite sur le même champ et sans refaire de référence. L’écart type des mesures vaut  $0,47 \text{ nm}$  et qualifie la répétabilité de la mesure.

#### 2.2.2.4 Influence de paramètres expérimentaux

En fonction des conditions dans lesquelles elles sont réalisées, les mesures effectuées peuvent être entachées d’erreur. Parmi les différentes conditions expérimentales qui peuvent être modifiées et influencer sur la mesure, on relève les principales :

- conditions d’illumination (cohérence spatiale, contraste de l’interférogramme),
- conditions d’imagerie (grandissement et ouverture numérique de l’objectif utilisé),
- échantillon (support, nature : fixé ou vivant, milieu d’immersion, milieu de montage...).

Afin de quantifier les erreurs de mesure en fonction de certaines de ces conditions, on cherchera à définir l’influence du grandissement et de l’ouverture numérique utilisés, qui

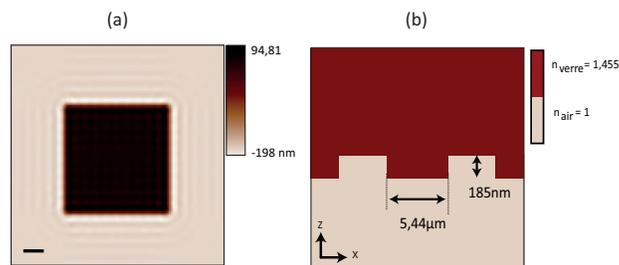


FIGURE 2.6 – (a) Image d’OPD simulée par *POC*, (b) Structure de l’échantillon ( $n_{\text{mire}} = 1,455$  et  $n_{\text{air}} = 1$  à  $\lambda=700$  nm). Éclairage cohérent, grandissement  $100\times$  et ouverture numérique  $n=1,3$ .

nous paraissent être les paramètres les plus critiques pour la mesure. L’influence de la nature du support et de l’échantillon seront pris en compte dans la mesure de l’écart type de l’OPD pour chaque expérience pour définir le niveau de bruit.

Pour des raisons essentiellement techniques, l’effet du grandissement et de l’ouverture numérique ont été évalués sur des images issues d’une simulation de ce même échantillon de silice illustré Figure 2.4. On peut ainsi simuler toutes les associations grandissement/ouverture numérique qui nous intéressent. Dans le cadre du régime projectif, cette simulation, à laquelle on fera référence sous le terme *POC* [43] (*pour* Product of convolution) est utilisée. Elle prend en compte le filtrage du microscope et les différentes conditions expérimentales (longueur d’onde, grandissement et ouverture numérique). Le but est de modéliser un objet d’épaisseur et d’indice connus. Une image résultant de cette simulation est présentée Figure 2.6.

L’algorithme basé sur le principe du produit de convolution [44] prend en compte les phénomènes de diffraction et de filtrage de l’objectif. L’objet simulé est découpé en tranches élémentaires d’épaisseur  $dz$  et chacune de ces tranches est convoluée par la tranche correspondante de la fonction de transfert optique (FTO) du système, traduisant la dégradation de l’information de l’objet par le système optique. On verra que l’on peut également simuler des conditions d’illuminations particulières. Dans ce chapitre, on se limitera à une illumination spatialement cohérente.

On étudie dans un premier temps l’influence du grandissement sur la mesure. A partir de ces images, l’information est extraite de la même façon que précédemment : un histogramme est réalisé sur la valeur des pixels et on mesure l’écart type du pic représentant les différents pixels du fond de l’image et la différence d’OPD entre le pic représentant les pixels du plot et celui représentant le fond.

On sait que pour une ouverture numérique de collection de 0,5, le signal n’est correctement échantillonné qu’à partir d’un grandissement valant  $80\times$  (Voir partie 1.2.4.4.2 concernant l’échantillonnage du signal sur le détecteur). On se place dans différentes configurations avec au minimum un grandissement de  $20\times$  en gardant la même ouverture numérique. Les

Grandissement	Ouverture numérique	OPD mesurée (nm)	Ecart type (nm)	Erreur (nm)
200	0,5	85,9	1,7	0,3
150	0,5	84,9	2,0	0,6
100	0,5	86,1	3,0	0,6
80	0,5	83,7	3,0	1,8
50	0,5	83,2	3,1	2,3
40	0,5	81,6	3,2	3,9
30	0,5	79,0	3,3	6,5
20	0,5	66,7	7,8	18,8

Tableau 2.2 – Effet du grandissement sur les valeurs d'OPD obtenues grâce à la simulation numérique par *POC*. On compare les valeurs d'OPD à la valeur moyenne de 85,5 nm déterminée par la mesure sur 4 champs différents de l'échantillon.

Grandissement	Ouverture numérique	OPD mesuré (nm)	Ecart type (nm)	Erreur (nm)
200	0,5	85,9	1,7	0,3
200	0,75	84,1	1,5	1,4
200	0,9	84,9	1,8	0,6
200	1	84,9	1,7	0,6
200	1,3	84,9	1,1	0,6

Tableau 2.3 – Effet de l'ouverture numérique sur les valeurs d'OPD obtenues sur des images issues d'une simulation numérique par *POC*. On compare les valeurs d'OPD à la valeur moyenne de 85,5 nm déterminée par la mesure sur 4 champs différents de l'échantillon.

résultats sont présentés dans le Tableau 2.2. On voit que la valeur de différence de chemin optique est toujours calculée avec des erreurs absolues de l'ordre du nm et en dessous à partir du moment où l'on est correctement échantillonné.

On modifie ensuite l'ouverture numérique de collection (l'éclairage étant toujours cohérent) en gardant un grandissement constant. D'après les résultats présentés dans le Tableau 2.3, l'ouverture numérique de collection ne semble pas avoir d'influence sur la valeur d'OPD déduite des images.

### 2.2.3 Conclusion sur la caractérisation de la mesure d'OPD

En conclusion de cette partie sur la caractérisation de la mesure, on a montré que la mesure d'OPD effectuée avait une résolution de 0,38 nm lorsque l'on réalisait une mesure sans moyennage, résolution qui peut aller jusqu'à 0,07 nm dans le cas où l'on moyenne 100 acquisitions. L'erreur sur la détermination de l'OPD commise sur un échantillon dont un

champ a été cartographié par AFM a été estimée à 1,29 nm sur 84 nm d'OPD en prenant comme référence la mesure d'AFM. La mesure possède une dispersion donnant une notion de fidélité de la mesure valant 1,7 nm.

La répétabilité de la mesure est évaluée à 0,47 nm.

La mesure ne semble pas être affectée par l'ouverture numérique de collection de l'objectif utilisé mais dépend de la façon dont est échantillonné le signal sur le détecteur.

Grandeur	Valeur (nm)	Conditions de mesure
Résolution	0,38	Sur champ vide d'une lamelle, sans moyennage
	0,07	Sur champ vide d'une lamelle, 100 acquisitions moyennées
Répétabilité	0,47	Evaluation sur une mire, 5 images acquises à la suite avec la même référence
Fidélité	1,7	Évaluation sur une mire caractérisée par AFM
Limite de détection	0,76 ( $2\sigma$ )	Sur champ vide d'une lamelle, sans moyennage
	0,14 ( $2\sigma$ )	Sur champ vide d'une lamelle, 100 acquisitions moyennées

Tableau 2.4 – Tableau récapitulatif des résultats issus de l'étude de caractérisation de la mesure d'OPD.

## 2.3 Mesure d'indice de réfraction sur échantillon calibré

Afin de valider le modèle décrit précédemment et notre capacité à mesurer des indices de réfraction avec une précision suffisante, une mesure est réalisée sur un échantillon d'indice et de diamètre connus constitué d'une fibre optique (fibre optique monomode, ref : SM980, Thorlabs) dans un milieu d'immersion d'indice mesuré grâce à un réfractomètre d'Abbe (2WAJ, HuiXia Supply, Chine). Le milieu d'indice a été réalisé pour créer un choc d'indice faible avec la gaine de la fibre et son indice a été mesuré à  $1,4457 \pm 10^{-3}$ .

Un filtre passe bande N-IR centré autour de  $\lambda = 700 \pm 30$  nm est utilisé afin de réduire la dispersion chromatique et permettre une mesure d'indice fiable.

La fibre est imagée de façon transversale de façon à connaître l'épaisseur de matériau traversé et ainsi pouvoir remonter à la valeur de l'indice. Les différents résultats de la mesure sont présentés Figure 2.7. On représente les différentes parties de la fibre schématiquement avec leurs dimensions caractéristiques (Figure 2.7(a)) et leur visualisation en différence de chemin optique est représentée sur la Figure 2.7(b).

Le revêtement étant très déphasant par rapport à la gaine et au cœur, on réalise la mesure dans une zone où la fibre a été dénudée (voir Figure 2.7(c)). La gaine est beaucoup plus déphasante que le cœur de la fibre, ce que l'on peut voir sur la Figure 2.7(c). Un profil

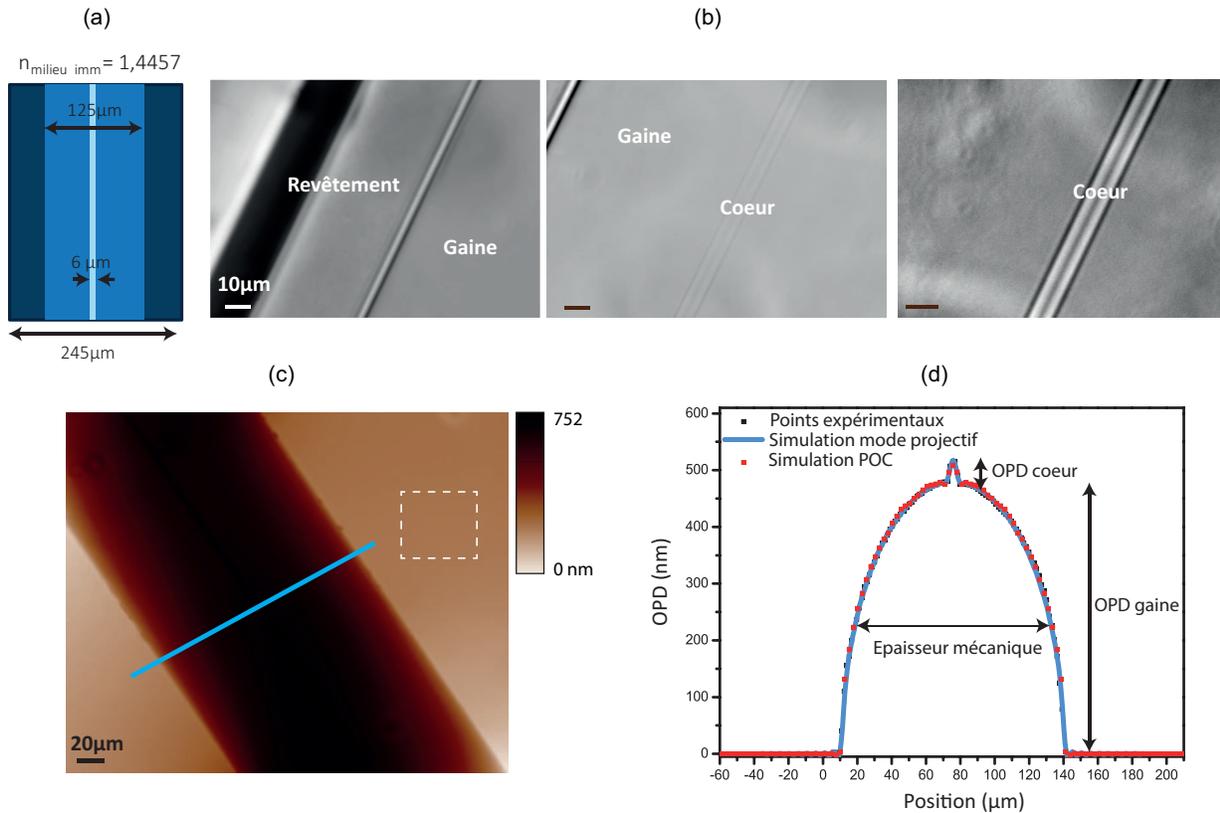


FIGURE 2.7 – (a) Représentation schématique de la fibre optique monomode imagée, (b) 3 images de phase quantitative des différents éléments de la fibre optique, (c) image d'OPD de la fibre. (d) Comparaison entre l'OPD mesurée et l'OPD simulée sous l'hypothèse du régime projectif. Observation au 100x (images (b)) et au 40x (image (c)),  $ON=0,6$ , source blanche filtrée grâce à un filtre passe bande  $700 \pm 30$  nm. Barre d'échelle =  $10\mu\text{m}$

tracé sur l'image 2.7(c) permet d'estimer les différentes épaisseurs de matériaux, le résultat est représenté sur la Figure 2.7(d). La courbe a le profil attendu si on considère l'imagerie de deux objets cylindriques et concentriques.

Les mesures d'indices présentées dans le tableau 2.5 sont le résultat de 10 mesures moyennées (10 profils tracés comme sur l'image 2.7(c)). Les profils tracés sur l'image nous permettent de déduire une valeur d'OPD ainsi qu'une valeur d'épaisseur mécanique en  $\mu\text{m}$ . On suppose que la fibre optique est homogène et cylindrique. Grâce à la relation (2.1), on peut estimer les différences d'indice moyennes  $dn_{(\text{coeur/gaine})}$  et  $dn_{(\text{gaine/milieu extérieur})}$  à partir des mesures d'OPD et de la connaissance de l'indice du cœur composé de silice fondue :  $n_{\text{coeur}}=1,45529$   $\lambda=0,7\mu\text{m}$  [45].

Une simulation de cette fibre en considérant un régime projectif est utilisée pour ajuster les valeurs expérimentales (voir Figure 2.7(d)).

Théorique	Cœur	Gaine
OPD (nm)	34,91	465,25
Épaisseur ( $\mu\text{m}$ )	6	125
dn	$5,82 \cdot 10^{-3}$ (par rapport à la gaine)	$3,77 \cdot 10^{-3}$ (par rapport au milieu)
Expérimental	Cœur	Gaine
OPD (nm)	$35,78 \pm 2,08$	$483,91 \pm 2,07$
Épaisseur ( $\mu\text{m}$ )	$6,84 \pm 0,74$	$131,04 \pm 0,74$
dn	$5,24 \cdot 10^{-3} \pm 0,5 \cdot 10^{-3}$	$3,69 \cdot 10^{-3} \pm 0,03 \cdot 10^{-3}$
indice	$1,4546 \pm 0,5 \cdot 10^{-3}$	$1,4494 \pm 0,03 \cdot 10^{-5}$

Tableau 2.5 – Résultats obtenus de la mesure sur fibre optique. Les données "théoriques" ont été calculées à partir des données constructeur concernant le diamètre et les indices des différents composants de la fibre. L'OPD théorique est obtenue en réalisant le produit  $dn \times$  épaisseur.

On confronte ces résultats à une seconde simulation, cette fois-ci en utilisant le modèle POC qui a pour but le calcul plus rigoureux d'objets de phase.

On voit que les 3 courbes se superposent parfaitement justifiant l'utilisation de l'approximation projective dans le cadre de cet échantillon.

Pour les valeurs théoriques, on utilise les spécifications du fabricant ( $ON_{\text{fibre}}=0,13$  et  $n_{\text{cœur}}=n_{\text{silice fondue}}$ ,  $e_{\text{cœur}}=6 \mu\text{m}$  et  $e_{\text{gaine}}=125 \mu\text{m}$ ).

On peut ainsi comparer les résultats issus de la mesure expérimentale à ce que l'on attend théoriquement considérant les valeurs d'OPD et l'épaisseur déduite des images (Figure 2.7 (d)).

On estime l'erreur sur la détermination du diamètre de la fibre à un pixel, ce qui correspond à une erreur de  $0,74 \mu\text{m}$ . L'erreur sur la mesure d'OPD est évaluée en mesurant l'écart type de la valeur des pixels d'une zone de  $50 \times 50$  pixels sur une zone vide de l'image (zone en pointillés blancs sur la Figure 2.7(c)).

En conclusion, les résultats de la mesure effectuée sur la fibre optique montrent qu'une détermination d'indice de réfraction est possible grâce à une mesure d'OPD dans le cadre du mode projectif avec une épaisseur de l'objet connue. L'erreur commise sur la détermination des indices respectifs du cœur de la fibre et de la gaine sont de l'ordre de  $10^{-4}$  et  $10^{-5}$ . La différence relevée sur la valeur des différences d'indices notées  $dn$  dans le Tableau 2.5 est principalement due au fait que l'épaisseur théorique considérée des différents composants de la fibre est éloignée de celle qui a été évaluée sur les images d'OPD. Il est plus juste, à mon sens, d'utiliser les données mesurées sur les images en ce qui concerne les paramètres de la fibre, les données constructeur peuvent avoir une certaine variabilité.

## 2.4 Application de la mesure projective en biologie : mesure de masse sèche

L'application présentée dans ce chapitre concerne la mesure de masse sèche d'organismes cellulaires dans le but de réaliser des classifications inter- et intra-populations. L'idée est de combiner critères morphologiques et quantitatifs pour comparer des cellules en fonction de l'étape du cycle cellulaire dans laquelle elles se trouvent ou encore mesurer l'effet d'un milieu sur leur croissance.

La masse sèche d'une cellule est une grandeur d'intérêt communément utilisée en biologie ou en physiologie et qui est relativement constante au sein d'une même espèce. Cette masse sèche correspondant à la somme des masses de tous les composants hors eau de la cellule (protéines, lipides, acides nucléiques, sucres ou encore minéraux...). Durant la vie d'une cellule, sa masse sèche étant liée à ses fonctions métaboliques et structurales, elle peut être profondément modifiée.

La valeur de la masse sèche au sein d'un même type cellulaire est un élément constant en moyenne. Par contre, cette valeur peut varier en fonction du type cellulaire, du cycle cellulaire et de l'environnement. La masse sèche moyenne et sa variabilité, si elles sont mesurées avec précision, peuvent être un critère objectif de comparaison au sein d'une population cellulaire ou entre différentes populations.

Il peut donc être intéressant d'utiliser cette grandeur pour extraire des informations sur une cellule unique ou sur toute une population de cellules. En effet, il serait possible alors de quantifier un phénomène de croissance qui entraînerait une augmentation de masse de l'individu étudié ou une modification du métabolisme et/ou des échanges avec le milieu extracellulaire qui ne se manifeste par aucun changement morphologique. Par exemple, dans ses travaux de 1958, Weiss [46] a démontré l'intérêt de la masse sèche pour mettre en évidence l'effet d'une enzyme appelée trypsine sur une population cellulaire. Cette enzyme, couramment utilisée en culture cellulaire, avait un effet qui n'était visible que sur la valeur de masse sèche des cellules traitées et qui ne modifiait ni leur taille ni leur viabilité.

Durant ces dix dernières années, la mesure de masse sèche a été utilisée pour étudier le cycle cellulaire de levures grâce à de l'holographie numérique [47], de cellules de mammifères [48], quantifier les modifications de biomasse de cellules lymphocytaires de type CD8 + T cells en réponse à un antigène spécifique [49], ou encore étudier des colonies de cellules souches [50].

Les études sur globules rouges sont nombreuses en raison du caractère peu variable de cette cellule, leur masse a été évaluée par différentes techniques [51, 52] et sert d'échantillon biologique de référence pour les techniques d'imagerie de phase qui sont particulièrement adaptées à cette mesure.

Outre la mesure de déphasage de la cellule, la mesure de masse sèche peut être réali-

sée de différentes façons. On peut citer la mesure de microscopie de fluorescence où l'on va mesurer la proportion d'un marqueur fluorescent et extrapoler cette information pour obtenir la biomasse totale de la cellule. L'inconvénient de cette technique est sa faible précision [53]. Une autre technique utilisant un *suspended microchannel resonator (SMR) mass sensor* [54] permet une mesure précise de masse mais ne permet pas de réaliser des études individuelles et de population en même temps [55, 56].

### 2.4.1 Principe de la mesure

Il a été montré que dans le cas de solutions, l'indice de réfraction était directement relié à la concentration massique du composé. En effet, dans le cas d'une solution, l'augmentation de la concentration massique d'un soluté dans un solvant produit une augmentation proportionnelle de l'indice de réfraction de la solution. La première observation de ce phénomène a été réalisée par Gladstone et Dale [57].

Une mesure d'indice de réfraction intégrée sur toute l'épaisseur physique du matériau donne ainsi une information sur la quantité de matière présente et sa masse. En 1952, Robert Barrer [51] a montré que cette relation était également applicable aux échantillons biologiques, et plus particulièrement à la cellule. Le déphasage accumulé pouvant directement être relié à sa masse sèche par un facteur noté  $\alpha$  et appelé *incrément spécifique d'indice de réfraction*.

En considérant la nouvelle variable d'intérêt qu'est la masse sèche, on peut réécrire la relation (2.1) comme suit :

$$\int_S OPD_{\text{projectif}}(x, y) \, dx \, dy = \alpha m \quad (2.3)$$

avec  $m$  la masse sèche de l'élément considéré.

L'OPD est intégrée suivant deux dimensions sur toute la surface de l'objet considéré et cette grandeur peut directement être reliée à la valeur locale de la masse sèche de l'élément. On verra par la suite que ce coefficient  $\alpha$  diffère peu suivant les composés biologiques, ce qui nous donnera la possibilité de considérer que la contribution à la valeur de l'indice de réfraction pour chaque entité au sein d'une cellule est la même.

On étudie la mesure projective dans le cadre d'un échantillon constitué d'une sphère de soluté dissout dans un solvant en suspension dans un milieu constitué par le même solvant (voir figure 2.8).

Utilisant la relation (2.1), on peut écrire :

$$OPD_{\text{projectif}}(x, y) = \int (n_{\text{soluté}}(x, y) - n_{\text{solvant}}) \, e_{\text{sphere}} \quad (2.4)$$

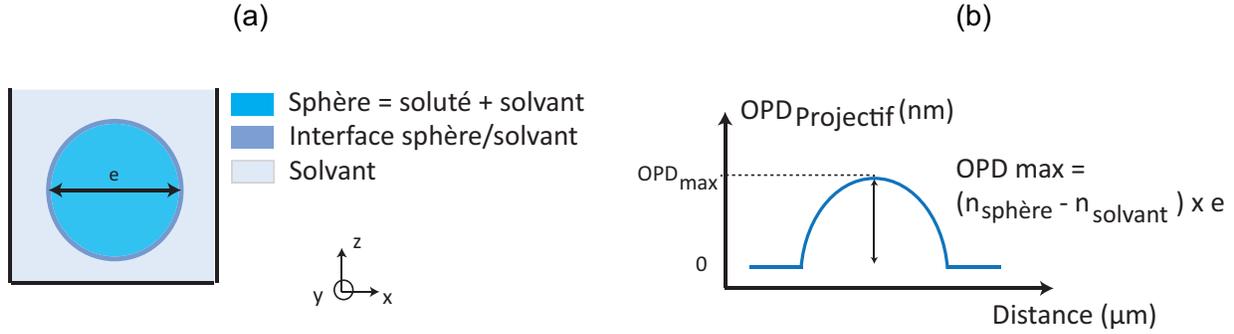


FIGURE 2.8 – (a) Schématisation de la sphère contenant solvant + soluté, (b) Illustration de l'OPD mesuré.

La sphère de soluté étant en équilibre osmotique avec le solvant environnant et le soluté étant confiné à l'intérieur de la sphère, on considère donc que la différence de chemin optique introduite par la sphère est égale à la différence de chemin optique d'une sphère identique de solvant à laquelle on ajoute la contribution du soluté.

En négligeant la contribution de la membrane devant celle de la solution *soluté+solvant* en raison de sa faible épaisseur, la différence de chemin optique introduite par la sphère peut s'écrire :

$$OPD_{\text{projectif}} = OPD_{\text{solvant}}(x, y) + \alpha \frac{m_{\text{soluté}}}{S_{\text{sphère}}}(x, y) \quad . \quad (2.5)$$

avec  $S_{\text{sphère}}$  la surface de la sphère projetée dans le plan perpendiculaire à l'axe optique d'imagerie.

On introduit maintenant une notation différente pour l'intégrale de l'OPD sur la surface de l'élément considéré. La nouvelle grandeur que l'on utilisera par la suite est appelée volume optique, ou plutôt différence de volume optique par analogie à la différence de chemin optique, et s'exprime en unité de volume.

$$\begin{aligned} \Delta V_{\text{optique}} &= \int_S OPD_{\text{projectif}}(x, y) \, dx \cdot dy \\ &= \int_S \left( OPD_{\text{solvant}}(x, y) + \alpha \frac{m_{\text{soluté}}}{S_{\text{gouttelette}}}(x, y) \right) dx \, dy \end{aligned} \quad (2.6)$$

$$\begin{aligned} \Delta V_{\text{optique}} &= \delta V_{\text{optique}}^{\text{solvant}} + \delta V_{\text{optique}}^{\text{soluté}} \\ &= \delta V_{\text{optique}}^{\text{solvant}} + \alpha m_{\text{soluté}} \quad . \end{aligned} \quad (2.7)$$

Dans le cas où plusieurs solutés sont présents dans la sphère, comme ce serait le cas pour une cellule par exemple, on peut écrire l'équation précédente pour chaque élément.

En sommant la contribution de chaque élément, on écrit :

$$\Delta V_{opt} = \sum_i \alpha_i \cdot m_i \quad (2.8)$$

Une mesure d'OPD intégrée sur l'objet peut nous permettre de déterminer la quantité de soluté au sein d'un échantillon. Dans le cas d'un milieu complexe comme la cellule biologique, contenant plus d'un soluté, on peut écrire :

$$\int_S OPD(x, y) \, dx \, dy = \sum_i \alpha_i m_i \quad (2.9)$$

avec  $\alpha_i$  mesurée pour les  $i$  différents éléments composant l'échantillon.

### 2.4.2 Valeurs du coefficient $\alpha$ , incrément spécifique d'indice de réfraction

Les coefficients  $\alpha$  de variation de l'indice de réfraction en fonction de la concentration massique de l'élément considéré diffèrent très peu. On peut néanmoins citer certains composés protéinés tel que le sérum bovin, ou l'ADN dont le coefficient prend des valeurs sensiblement plus importantes que celles obtenues pour des molécules plus petites. Le coefficient  $\alpha$  varie de  $0,140 \mu\text{m}^3/\text{pg}$  pour les composés simples à  $0,180 \mu\text{m}^3/\text{pg}$  pour les composés complexes en suspension dans l'eau [58, 59, 60, 61].

Pour la cellule biologique, le coefficient  $\alpha$  varie de  $0,18-0,21 \mu\text{m}^3/\text{pg}$  en fonction de la teneur en protéines de la cellule. Barer a défini un coefficient  $\alpha$  de  $0,18 \mu\text{m}^3/\text{pg}$  pour la plupart des cellules eucaryotes. Cette valeur est celle utilisée en général par les personnes de la communauté de la mesure de phase quantitative et il n'y a que pour certaines lignées particulières de cellules que cette valeur peut varier. Par exemple, elle est de  $0,19 \mu\text{m}^3/\text{pg}$  pour les globules rouges considérant le fait que ce type cellulaire contient une quantité importante d'une protéine particulière : l'hémoglobine.

L'élément important résultant de ceci est le fait que l'on pourra considérer comme un ensemble les différents éléments d'un échantillon. On ne pourra pas quantifier la proportion de chaque entité au sein de cet échantillon mais la masse globale de l'ensemble de ces entités.

En conclusion, une simple mesure d'OPD intégrée sur toute la surface d'une cellule, en supposant un élément peu épais et dont la différence d'indice avec le milieu d'immersion (ici un tampon ou un milieu de culture) est faible, permet de remonter à une mesure de masse sèche de la cellule grâce à un coefficient empirique. Il est important de noter que cette mesure ne peut être réalisée que si la cellule est placée dans un milieu d'immersion constitué d'eau. A titre d'exemple, la mesure de masse sèche ne peut être réalisée sur un frottis où les cellules sont simplement étalées sur un support.

### 2.4.3 Réalisation expérimentale

Le montage expérimental pour réaliser cette mesure est schématisé sur la Figure 2.9. Il est constitué d'un microscope inversé classique (TE2000-U, Nikon, Japan) avec un éclairage de Köhler. Un filtre passe haut ( $\lambda > 700$  nm) est utilisé afin de réduire la phototoxicité et permettre des acquisitions longue durée sur cellules vivantes et pour éviter la dispersion chromatique.

Les échantillons imagés sont constitués de cellules adhérentes déposées sur un support de type  $\mu$ dish (Ibidi, Planegg, Germany). Les cellules sont étalées sur le support et individualisables afin de pouvoir définir les limites de chacune d'entre elles, il faut donc veiller à ne pas atteindre un niveau de confluence trop important.

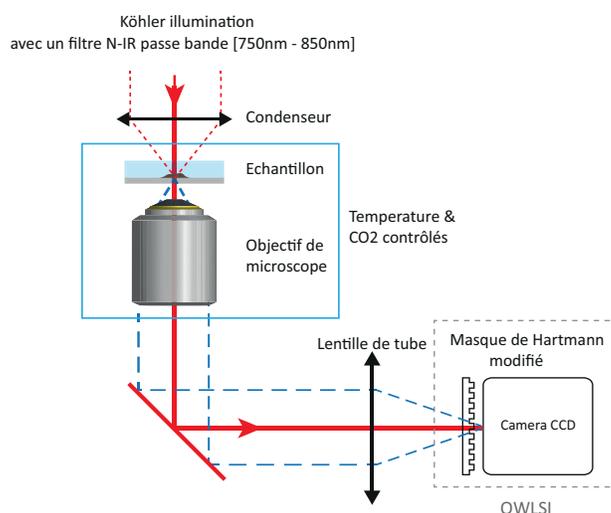


FIGURE 2.9 – Schéma du montage expérimental pour la mesure de masse sèche dans le cadre du régime projectif.

### 2.4.4 Caractérisation de la mesure

Nous venons de voir l'intérêt de pouvoir réaliser une mesure de masse sèche dans le cadre d'une étude en biologie et comment la mettre en œuvre en microscopie. Dans cette seconde partie, nous allons chercher à caractériser cette mesure en fonction des différents paramètres expérimentaux que l'on peut faire varier mais également en terme de bruit de mesure et d'erreur sur le résultat donné.

Une segmentation basée sur un algorithme de ligne de partage des eaux [62] issu de la morphologie mathématique est utilisée afin d'extraire des images les paramètres que sont la surface et le volume optique en vue d'une mesure de masse sèche. Les détails de la segmentation sont présentés en [Annexe A](#).

L'intérêt d'utiliser un algorithme automatique pour segmenter les images est d'utiliser des

critères objectifs et non soumis à l'utilisateur. On réalisera une étude comparative dans le but de justifier l'utilisation d'une segmentation automatique au lieu d'une segmentation manuelle.

Nous avons caractérisé précédemment la mesure d'OPD. Dans cette partie, nous allons caractériser la mesure de masse sèche. Les images étant toujours segmentées avant la mesure de masse, il faudra donc ajouter au bruit de mesure une incertitude de segmentation qui peut également dépendre des conditions expérimentales.

#### 2.4.4.1 Erreur de segmentation

On évalue en premier lieu l'erreur commise par notre algorithme de segmentation en utilisant l'algorithme de simulation POC.

Des images d'OPD de billes ( $n_{bille} = 1,47$ ,  $n_{milieu} = 1,5$ ) de différents rayons évoluant de 2,5 à 20  $\mu\text{m}$  ont été simulées afin de pouvoir comparer la valeur issue de la segmentation à la valeur théorique. Chaque image a été segmentée au mieux manuellement et automatiquement et les résultats sont montrés dans le Tableau 2.6. On comparera les valeurs issues de la segmentation à une valeur dite *théorique* obtenue en considérant le volume d'une sphère de rayon  $R$  donné ( $V_{sphère} = 4/3 \pi R^3$ ). On peut voir que l'erreur relative réalisée par la segmentation manuelle est toujours plus élevée que la segmentation automatique. Évidemment, il faut prendre en compte le fait que l'erreur de segmentation a été calculée sur des images idéales non bruitées mais les objets segmentés ont également une structure qui ne correspond pas aux objets généralement segmentés (pas de noyau et variation du déphasage différente avec des contours plus abrupts que pour des cellules).

Rayon ( $\mu\text{m}$ )	Volume optique théorique ( $\mu\text{m}^3$ )	Volume optique mesuré automatiquement ( $\mu\text{m}^3$ )	Erreur relative (%)	Volume optique mesuré manuellement ( $\mu\text{m}^3$ )	Erreur relative (%)
2,5	1,96	1,96	0,02	2,51	0,28
3	3,39	3,39	0,03	4,58	0,35
5	15,71	15,70	0,08	23,88	0,52
7	43,10	43,07	0,03	69	0,6
10	125,67	125,67	0	175,94	0,4
15	424,11	424,34	0,05	453,80	0,07
20	1005,31	1004,72	0,06	1327	0,32

Tableau 2.6 – Erreur relative de segmentation. Comparaison des mesures de volume optique obtenues grâce à une segmentation manuelle et automatique réalisées respectivement par l'utilisateur et l'algorithme de segmentation automatique au volume optique théorique d'une bille de rayon  $R$  variant de 2,5  $\mu\text{m}$  à 20  $\mu\text{m}$ .

#### 2.4.4.2 Répétabilité de la segmentation

Pour déterminer la répétabilité de la segmentation, 100 images d'un même champ d'un échantillon contenant 2 cellules de type HeLa placées dans un milieu aqueux et dans un support  $\mu$ dish sont prises le plus rapidement possible.

Les cellules HeLa sont une lignée cellulaire cancéreuse couramment utilisée en biologie cellulaire. Elles proviennent d'un prélèvement de métastase effectué sur la patiente Henrietta Lacks atteinte d'un cancer du col de l'utérus. Il s'agit de la première lignée cellulaire immortelle d'origine humaine.

L'échantillon est fixé au paraformaldehyde 4% dans le PBS pendant 10 mn au préalable pour pouvoir négliger les fluctuations dues à l'échantillon devant les fluctuations de la mesure. L'acquisition totale dure 50 secondes et l'imagerie est réalisée à l'aide d'un objectif à air de grandissement  $40\times$  et d'ouverture numérique 0,75.

On optimise les paramètres de segmentation (taille du noyau et rayon de l'élément avec lequel on va scanner l'image) pour la première image et on segmente la pile d'image avec ces mêmes paramètres.

Un exemple est présenté en Figure 2.10. On en déduit pour les 2 cellules de l'image une masse sèche moyenne et l'écart type de cette valeur rendant compte de la dispersion de la mesure. L'écart type de la valeur de masse sèche pour les 100 acquisitions successives est inférieur à 0,5 pg (voir Figure 2.10 et Tableau 2.7). L'erreur relative est donc inférieure à 0,15 % pour les cellules imagées.

Le même type de mesure à été réalisé sur 13 cellules d'un même échantillon. L'erreur sur la mesure a été évaluée à 0,14%, ce qui permet de quantifier sa répétabilité.

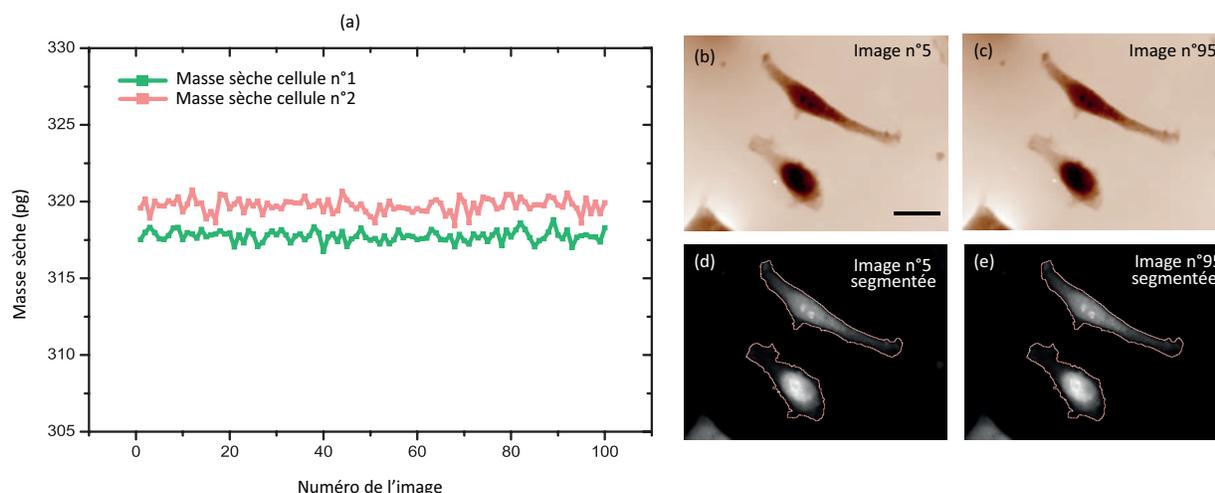


FIGURE 2.10 – (a) Évaluation de la fluctuation de la mesure de masse sèche de 2 cellules HeLa fixées. L'imagerie a été effectuée avec un objectif à air de grandissement  $40\times$  et d'ouverture numérique  $ON=0,75$ . Le grandissement total du système d'imagerie est de  $80\times$  afin d'échantillonner correctement le signal sur le détecteur. (b) & (c) Images d'OPD brute du champ où les deux cellules sont imagées. (d) & (e) Résultat de la segmentation des images (b) & (c).

Cellule n1			
	Surface ( $\mu\text{m}^2$ )	Volume optique ( $\mu\text{m}^3$ )	Masse sèche (pg)
Moyenne	832,1	57,19	317,74
Ecart type	1,6	0,07	0,37
Erreur relative $\sigma/m$ (%)	0,2	0,12	0,12
Cellule n2			
	Surface ( $\mu\text{m}^2$ )	Volume optique ( $\mu\text{m}^3$ )	Masse sèche (pg)
Moyenne	759,8	57,52	319,56
Ecart type	2,7	0,08	0,46
Erreur relative $\sigma/m$ (%)	0,4	0,14	0,14

Tableau 2.7 – Récapitulatif des mesures effectuées sur 2 séries de 100 images prises successivement et segmentées automatiquement.

#### 2.4.4.3 Influence du grandissement sur la segmentation

On utilise le même échantillon de cellules fixées que précédemment pour regarder l'influence du grandissement de l'objectif utilisé sur la mesure. En effet, en biologie les échantillons observés, qui sont souvent des cellules, ont des tailles différentes et adapter le grandis-

sement peut s'avérer nécessaire. Dans un premier temps, on travaille à ouverture numérique de l'objectif constante afin de faire varier uniquement le paramètre qui nous intéresse ici. On utilise pour cela un unique objectif (40× et NA=0,75) et différentes lentilles de tube (1x, 1,5x et 2x) pour réaliser 3 grandissements différents 40×, 60× et 80×.

Chaque image est le résultat d'une acquisition moyennée 30 fois.

Les résultats sont présentés dans le Tableau 2.8.

La dispersion des mesures de volume optique est de  $0,09 \mu\text{m}^3$  lorsqu'on utilise différents grandissements à ouverture numérique constante et les valeurs de masse sèche mesurées sont données à  $\pm 0,5 \text{ pg}$ , ce qui correspond à une erreur relative de 0,07%. Il est intéressant de noter que même dans le cas où l'on échantillonne mal le signal sur le détecteur (par exemple en utilisant un grandissement de 40x), on mesure un résultat très proche de celui obtenu avec les autres grandissements : l'information de masse est conservée.

Grandissement (x)	Surface ( $\mu\text{m}^2$ )	Volume Optique ( $\mu\text{m}^3$ )	Masse sèche (pg)
40	2189	121,9	677,2
60	2148	122,0	677,7
80	2155	122,1	678,2
Ecart type	21.9	0,1	0,5

Tableau 2.8 – Influence de l'utilisation de différents grandissements sur la mesure de volume optique et de surface pour l'imagerie d'un échantillon de cellules HeLa fixées.

#### 2.4.4.4 Influence de la mise au point sur la segmentation

On cherche à évaluer maintenant l'influence de la mise au point sur la mesure de volume optique ou de masse sèche. Il est difficile de faire une mise au point parfaite, notion qui est d'ailleurs dépendante de la zone à observer et de la morphologie cellulaire. Quand la cellule est étalée, on doit faire la mise au point sur la surface de contact avec le substrat. On peut s'aider de l'intensité, la mise au point correspondant au moment où le contraste est le plus faible. Mais quand la cellule est en mitose, et fortement arrondie, il est préférable de faire la mise au point dans le plan équatorial, pour ne pas introduire de biais dans la segmentation et la mesure de masse sèche. Cela introduit une certaine variabilité qu'il faut mesurer. On choisit d'effectuer la mesure sur 2 échantillons de dimensions différentes : une cellule en mitose de diamètre de plusieurs dizaines de microns et une levure de  $5\mu\text{m}$  de diamètre afin de voir si la dimension de l'objet a une influence sur la variation du chemin optique avec le plan de mise au point.

Expérimentalement, on décrit l'échantillon suivant l'axe optique en modifiant la distance objectif/échantillon afin de focaliser à des plans différents (de  $-15 \mu\text{m}$  à  $+10\mu\text{m}$  pour

la cellule et de  $-8 \mu\text{m}$  à  $+10 \mu\text{m}$  pour la levure). Une image est prise pour chaque plan puis segmentée. On reporte alors la valeur de différence de volume optique en fonction du plan de focalisation sur des graphiques présentés sur la Figure 2.11.

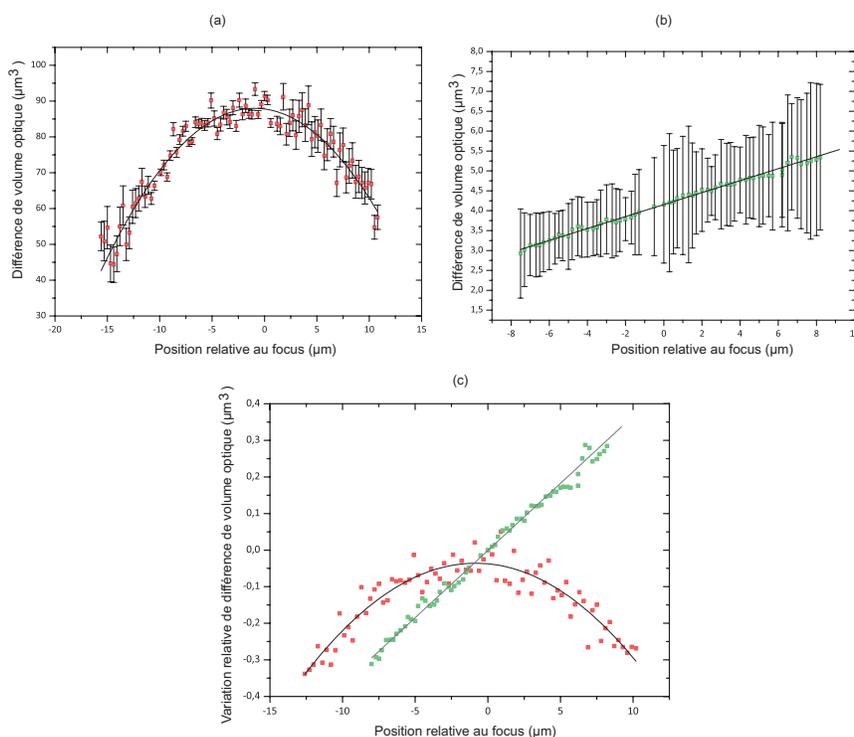


FIGURE 2.11 – (a) Evolution du volume optique avec la mise au point pour une cellule COS-7 en mitose de  $40 \mu\text{m}$  diamètre (carrés rouges) et (b) une levure de type *S.cerevisiae* de  $5 \mu\text{m}$  de diamètre (carrés verts). (c) Résultats précédents tracés relativement au plan de mise au point. Les barres d'erreur ont été calculées en évaluant l'écart type d'une zone vide de  $50$  par  $50$  pixels sur chaque image de la pile.

En utilisant l'approximation projective, on avait émis l'hypothèse que la valeur de différence de chemin optique ne dépendait pas de la mise au point qui était réalisée ou du plan dans lequel on réalisait la mesure. L'expérience démontre le contraire et il est intéressant de noter que le comportement de l'OPD est différent avec le plan de mise au point suivant l'objet imagé.

La valeur d'OPD est maximale au niveau du focus pour la cellule en boule de diamètre valant plusieurs dizaines de  $\mu\text{m}$  avec une forme parabolique qui permet, après ajustement de la courbe, de repérer le maximum avec précision. On peut donc imaginer prendre une série d'images dans des plans différents pour repérer le plan où l'objet est au focus puisque la mesure de masse sèche apparaît comme étant sensible à la mise au point.

Pour le second objet, la levure, de quelques  $\mu\text{m}$  de diamètre, la variation est linéaire et il n'est pas possible de trouver un critère objectif pour définir une valeur d'OPD correspondant au focus à l'aide de la courbe.

L'hypothèse est que la nature de l'objet (notamment son caractère absorbant) va influencer sur l'effet de la mise au point sur la mesure de masse sèche. Le fait que l'OPD puisse varier fortement sur une petite plage autour du focus peut être un atout dans le cas où l'on veut quantifier ou contrôler une dérive ou une modification du focus. On envisage d'ailleurs d'exploiter ce phénomène pour réaliser un autofocus en 3D pour l'imagerie.

#### 2.4.4.5 Influence de la cohérence spatiale sur la segmentation

On a fait l'hypothèse que la cohérence spatiale de l'illumination utilisée était un critère nécessaire à la réalisation d'une mesure quantitative. Il est intéressant de regarder comment cette cohérence affecte la mesure de masse sèche. En effet, ce paramètre est assez critique du point de vue expérimental puisque ce réglage dépend fortement de l'utilisateur et de l'expérience réalisée.

On utilise à nouveau l'échantillon de cellules HeLa fixées et des mesures d'OPD sont réalisées pour différentes valeurs d'ouvertures numériques du condenseur.

Le condenseur utilisé est un condenseur classique Nikon à ouverture maximale de 0,52. L'ouverture du condenseur est contrôlée grâce à des objets cylindriques dont le diamètre est connu et le diamètre de la plus grande ouverture considérée pour nos mesures est de 12 mm et correspond à une ouverture égale à 0,22 du condenseur.

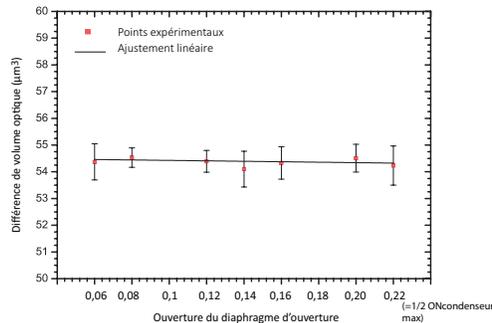


FIGURE 2.12 – Evolution de l'OPD avec la cohérence spatiale. Mesures réalisées sur un échantillon de cellules fixées avec un objectif à air (grandissement 40×, ON=0,75) et un condenseur classique.

On constate que la différence de volume optique varie peu en fonction de la cohérence spatiale à condition d'utiliser des optiques à faible ouverture numérique. En effet, dans notre cas ( $ON_{\text{illumination}}=0,08$  et  $ON_{\text{collection}}=0,75$ ), on peut réaliser une régression linéaire des différentes valeurs avec une pente de  $1,6 \cdot 10^{-2} \mu\text{m}^3/\text{mm}$  et la valeur de différence de volume optique est donnée avec un écart type de  $0,4 \mu\text{m}^3$  sur une valeur moyenne de  $54,3 \mu\text{m}^3$ .

On verra que dans le cas où on utilise un condenseur et un objectif tous deux à forte ouverture numérique, la valeur d'OPD sera très dépendante de la cohérence spatiale. Cette observation fait d'ailleurs l'objet d'une application développée dans le chapitre 4.

### 2.4.5 Application à la mesure de masse sèche de globules rouges

Les globules rouges sont des cellules très étudiées quand il s'agit de définir la justesse des mesures de masse sèche [63, 64, 65]. En effet, leur faible variabilité permet de mesurer et de comparer des valeurs moyennes entre différentes techniques de mesures, mesures qui sont moins dépendantes de l'échantillon que dans le cas de cellules où il faut faire attention à la façon dont elles ont été mises en culture, au nombre de passages, à la confluence...

On étudie la mesure de masse sèche sur une population de globules rouges extraits d'un échantillon de sang humain de donneur sain et dilué dans une solution de PBS à une concentration finale de 0,1%. L'échantillon a été ensuite marqué en fluorescence grâce à une molécule Hoechst 33342 (un intercalent de l'ADN) de façon à différencier les globules rouges qui ne contiennent pas d'ADN des autres cellules sanguines comme les leukocytes et qui peuvent être très proche d'un point de vue morphologique.

L'imagerie est réalisée dans un support 2 puits Labtek type II (Nunc, Denmark) à température ambiante avec un objectif à immersion de grandissement  $100\times$ ,  $ON=1,3$ . Afin d'obtenir un échantillonnage optimal sur le détecteur, on utilise un grandissement supplémentaire de  $2\times$ .

Un exemple d'image d'OPD obtenue est présenté Figure 2.13(a). Sur la Figure 2.13(b), on présente l'image 2.13(a) à laquelle on a appliqué un filtrage fréquentiel passe haut qui a pour effet d'enlever certaines basses fréquences. On verra plus tard dans cette étude l'effet d'une perte fréquentielle sur la mesure de différence de volume optique et de masse sèche.

La forme assez particulière en disque biconcave du globule rouge est mise en évidence grâce à un profil tracé sur la Figure 2.13(a).

Afin de mesurer la résolution sur cette image, l'écart type de la valeur d'OPD des pixels d'une zone de  $50 \times 50$  pixels (rectangle en traits pointillés sur la Figure 2.13(a) est calculé. On trouve une valeur de 0,38 nm.

Une étude de population est réalisée sur 224 globules rouges. On prend 116 images d'OPD en imageant différentes parties de l'échantillon. Chaque image contenant un ou plusieurs globules rouges est ensuite segmentée et les résultats sont analysés.

Les résultats sont présentés Figure 2.14 (a) et (b). On utilise une représentation de la répartition de la population en terme de volume optique grâce à un histogramme. On voit que l'histogramme a une forme gaussienne et est centré autour d'une valeur de masse sèche de 31,0 pg. L'écart type de cette valeur est de 2,8 pg, ce qui correspond à 9% de la valeur médiane de masse sèche, ce qui rend compte de la plus faible variabilité de cette population comparé à d'autres types cellulaires comme on le verra dans la suite de l'étude. On a défini la variabilité de la mesure dans la partie caractérisation de ce chapitre à 0,5 pg pour 320 pg mesurés, ce qui correspondait à 0,15%. La variabilité mesurée est donc essentiellement la variabilité de la population. Cette valeur est tout à fait comparable à celles trouvées

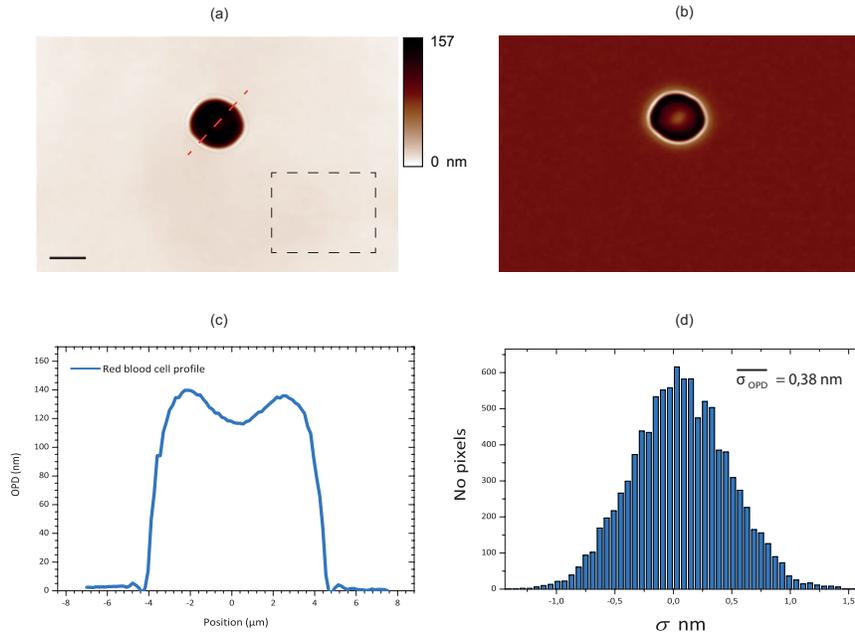


FIGURE 2.13 – (a) Image brute d’OPD et (b) image d’OPD avec application d’un filtrage passe haut de 30% des fréquences maximales de l’image d’un globule rouge. (c) Profil tracé sur l’image (a) suivant la ligne en pointillés. (d) Histogramme de la valeur d’écart type d’OPD mesuré sur le rectangle sur l’image (a).

dans la littérature et atteste de la pertinence de notre mesure pour la détermination de masse sèche de cellules. En effet, on peut citer plusieurs valeurs mesurées avec différentes techniques interférométriques : 31,4 pg [51], entre 27 et 32 pg [52] et dans des travaux plus récents, on trouve une valeur également très proche de  $27,2 \pm 5,3$  [64].

Étant donné le faible déphasage de certaines structures cellulaires, un filtrage fréquentiel de la carte de phase peut être réalisé pour augmenter le contraste des détails (voir Illustration Figure 1.8). L’équation 2.10 propose l’expression d’un filtre d’ordre  $n$  dans l’espace de Fourier :

$$\tilde{H}_n(\nu) = \left( \frac{\nu/\nu_0}{1 + \nu/\nu_0} \right)^n \quad (2.10)$$

Avec  $\nu_0$  la fréquence de coupure du filtre et  $n$  l’ordre du filtre.

Ce filtrage est analogue à celui qui est réalisé pour réaliser une mesure de phase avec certaines techniques [24]. Le problème majeur de l’utilisation d’un filtre passe-haut pour l’imagerie est l’apparition d’artefacts sous forme de halo sur la carte de phase filtrée. Ils sont visibles en périphérie de zones de transition, comme la membrane par exemple. Ce mode de filtrage permet de conserver l’information quantitative pour les objets dont les fréquences spatiales n’ont pas été filtrées mais on peut voir d’après les résultats présentés ci-dessous que la mesure peut en être affectée.

En effet, les basses fréquences de l’image correspondent aux valeurs moyennes. Dans le cas

d'objets comme des cellules ou ici des globules rouges, cette valeur moyenne est importante pour la mesure de masse sèche.

Les images de globules rouges ont été filtrées avec un filtre passe-haut d'ordre 0, avec un ajustement de la fréquence de coupure à  $\nu_0=1\%$  du maximum de fréquences de l'image. Les résultats de ce filtrage sur la valeur de masse sèche moyenne sont représentés sur la Figure 2.14 (c).

On trouve une valeur moyenne de masse sèche de  $21,9 \pm 4,0$  pg, ce qui représente une différence de 10 pg soit près d'un tiers de la valeur mesurée sans filtrage. On voit donc ici la nécessité d'éviter tout type de filtrage des images si le but est de réaliser une mesure.

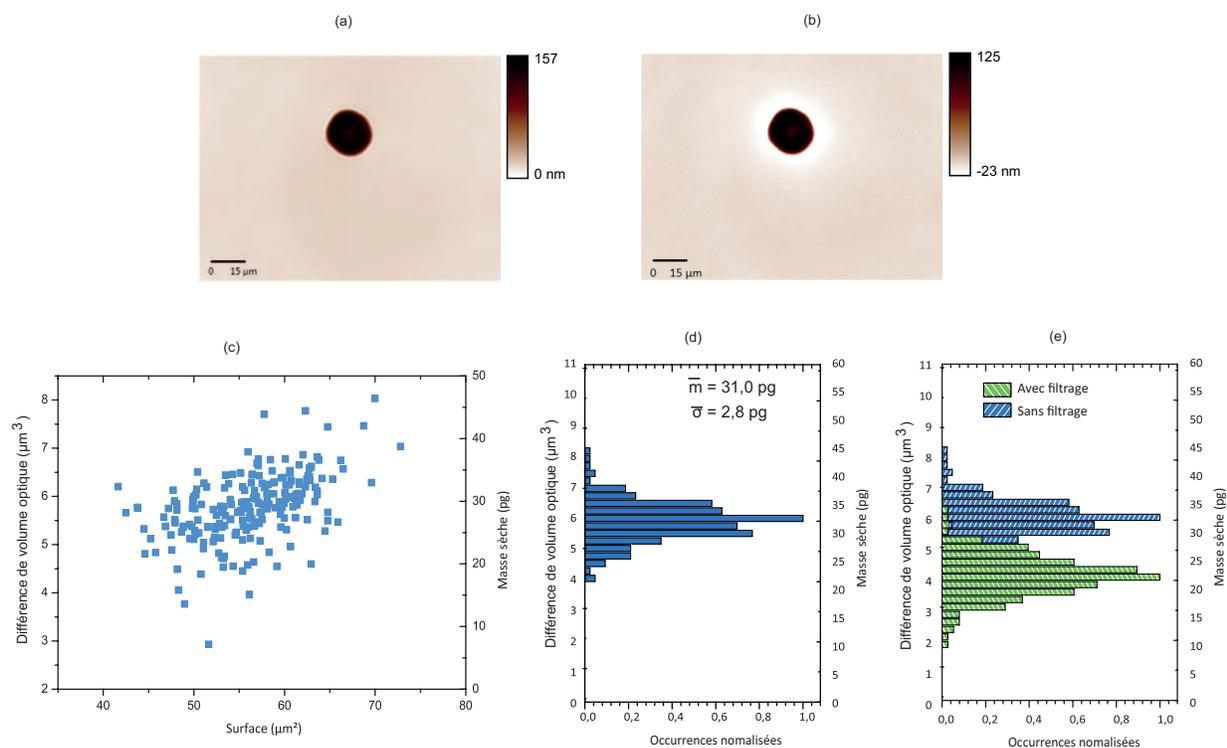


FIGURE 2.14 – (a) Exemple d'image brute d'OPD d'un globule rouge, (b) image d'OPD filtrée à l'aide d'un filtrage passe haut, (c) représentation graphique du volume optique/masse sèche en fonction de la surface pour la population de globules rouges étudiée (carrés bleus). Représentation sous forme d'histogramme en fonction du volume optique/masse sèche de la répartition de la population de globules rouges (d) sans et avec (e) application du filtre passe haut sur les images. L'imagerie est réalisée avec un objectif à immersion de grandissement  $100\times$ . le grandissement total est de  $200\times$ ,  $ON=1,3$ .

### 2.4.6 Conclusion sur la partie caractérisation de la mesure de masse sèche

Avec cette première étude métrologique, on peut conclure que la mesure de masse sèche a été caractérisée du point de vue des différents paramètres expérimentaux.

La segmentation a été éprouvée sur des simulations. L'erreur réalisée sur une mesure de volume optique est de 0,7%. L'erreur sur la mesure a été calculée à 0,14% sur 100 images prises à la suite de 13 cellules d'un même échantillon.

On a quantifié la dépendance de la mesure au grandissement, à l'ouverture numérique, à la cohérence spatiale et les erreurs commises sur la mesure finale par l'étape de segmentation. Le paramètre apparaissant le plus critique dans cette étude est la mise au point qui est le facteur entraînant le plus d'erreur avant la segmentation réalisée.

Une comparaison de valeurs de masses sèches de globules rouges a été effectuée avec des valeurs obtenues grâce à d'autres techniques interférométriques. On peut comparer la valeur moyenne obtenue grâce à notre mesure sur une population de plusieurs centaines de cellules de  $31,0 \pm 2,8$  pg et ainsi en conclure que notre mesure est tout à fait en accord avec les valeurs trouvées dans la littérature.

## 2.5 Exemples de mesure de masse sèche en biologie

Le but de ces études de masse sèche de cellules est de réaliser des comparaisons inter ou intra populations à l'aide d'un critère objectif dépendant peu des conditions expérimentales (*i.e.* imagerie ou nature (autre que biologique) de l'échantillon).

On peut réaliser différents types d'études en fonction de l'information recherchée que ce soit à l'échelle d'une cellule ou d'une population. A l'échelle d'une cellule, on peut évaluer la durée d'un cycle cellulaire ou encore identifier des étapes du cycle dans laquelle la cellule se trouve. On peut également mesurer des taux de croissance. A l'échelle d'une population, un critère intéressant est l'indice mitotique qui permet d'évaluer le pourcentage de cellules en division sur toute la population. On sait que cet indice est directement relié à la nature saine ou cancéreuse d'une population cellulaire ou d'un tissu.

On analysera également la variabilité de la masse sèche dans une population, afin de classer les individus de l'échantillon en sous populations.

Afin de représenter les résultats obtenus dans les études suivantes, on utilisera différentes représentations graphiques et un test statistique qui nous permettra de juger du caractère significatif des résultats.

## 2.5.1 Tests statistiques et représentations des données

### 2.5.1.1 Réalisation d'un test statistique

Il est nécessaire, en particulier en biologie où la variabilité est souvent forte, d'utiliser un test statistique pour juger de la signification des résultats obtenus.

Le test qui a été choisi ici est le test Mann et Whitney U [66] car il s'applique quelle que soit la distribution des populations et ne suppose aucune hypothèse sur les populations.

Le test de Mann et Whitney U est un test d'identité qui s'applique sur deux séries de valeurs numériques issues d'une même distribution. Ce test permet d'effectuer la comparaison de deux échantillons indépendants ne vérifiant pas la condition de "normalité".

Ce test est non paramétrique, c'est-à-dire qu'il ne fait pas d'hypothèse sur les formes analytiques des distributions ni sur les populations. Si l'on dispose de 2 échantillons a et b dont les moyennes ( $m_a$  et  $m_b$ ) et les variances ( $s_a^2$  et  $s_b^2$ ) sont des estimateurs des moyennes ( $\mu_a$  et  $\mu_b$ ) et variances ( $\sigma_a^2$  et  $\sigma_b^2$ ) des 2 populations A et B d'où sont issus les échantillons, la question posée par le test est : si  $m_a$  et  $m_b$  sont différents en est-il de même pour  $\mu_a$  et  $\mu_b$ ?

Hypothèse nulle : "H0 = les moyennes  $\mu_a$  et  $\mu_b$  sont égales"

Hypothèse alternative : "H1 = les moyennes  $\mu_a$  et  $\mu_b$  sont différentes"

Avec ce test, le calcul ne porte pas sur les valeurs numériques des mesures issues des échantillons représentatifs des populations mais sur leurs rangs attribués suite au classement des valeurs par ordre croissant. On s'affranchit ainsi des conditions de normalité des distributions et d'homogénéité des variances qui sont indispensables pour les tests paramétriques. Ce test peut également être appliqué dans le cas où on a de petits échantillons ( $N \approx 20$ ).

Pour analyser les données, on commence par classer dans l'ordre croissant l'ensemble des mesures des 2 groupes étudiés, puis on calcule la somme des rangs de chacun des groupes que l'on appellera  $R_a$  et  $R_b$  et le nombre de valeurs  $N_a$  et  $N_b$  de chaque échantillon. On en déduit les indices  $U_a$  et  $U_b$  donnés respectivement par les formules :

$$\begin{aligned} U_a &= R_a - N_a \cdot \frac{N_a + 1}{2} \\ U_b &= R_b - N_b \cdot \frac{N_b + 1}{2} \end{aligned} \tag{2.11}$$

On prendra  $U = \min(U_a; U_b)$  On calcule maintenant  $\mu$ ,  $\sigma_U$  et  $\epsilon$  qui nous permettront de déduire la probabilité p qui vérifiera ou non l'hypothèse testée. Dans notre cas, on testera toujours l'hypothèse : "les différences de volume optique (ou de masse sèche) observées

entre les 2 échantillons sont significatives".

$$\left\{ \begin{array}{l} \mu = \frac{N_a \cdot N_b}{2} \\ \sigma_U = \sqrt{\frac{(N_a \cdot N_b) \cdot (N_a + N_b + 1)}{12}} \\ \epsilon = \frac{U - \mu}{\sigma_U} \\ p = 1 - \frac{1}{\sqrt{2\pi}} \exp\left(-\frac{\epsilon^2}{2}\right) \end{array} \right.$$

Généralement, on considérera que l'hypothèse est rejetée si  $p > 0,05$ .

### 2.5.1.2 Représentations des données

On utilisera différentes représentations afin de présenter de façon visuelle les résultats. On commence par représenter la population étudiée à un instant  $t$ . Les différentes mesures, issues de la prise d'images successives de l'échantillon, sont représentées par des points dans un espace volume optique ou masse sèche en fonction de la surface. Chaque point au sein de ce graphique représente une cellule (voir Figure 2.19(a) & (b)). L'idée est de voir dans quelle zone du graphique se place chaque population.

Grâce à ce type de graphique, on peut montrer des différences de répartition ou des déplacements de population au sein du graphique en fonction de facteurs extérieurs du type milieu de culture ou température...

On peut également représenter les différentes sous populations au sein de diagrammes circulaires afin de pouvoir comparer simplement des différences de répartition suivant différentes classes établies de deux populations (voir Figure 2.20(c) & (d)).

Le troisième type de représentation est un diagramme de boîtes à moustaches. Ce mode de représentation permet d'évaluer la dispersion des mesures effectuées sur les différentes populations en représentant les grandeurs médiane, premier et troisième quartile de la distribution (voir figure 2.19(c) & (d)).

Enfin, la dernière représentation graphique correspond à un histogramme de fréquences en fonction de la valeur de volume optique ou masse sèche. On peut visualiser la forme de la répartition des différentes populations et en déduire la valeur moyenne ainsi que l'écart-type des valeurs (voir Figure 2.19(a) & (b)).

## 2.5.2 Étude quantitative de masse sèche de levures

### 2.5.2.1 Cycle cellulaire

Avant de présenter les résultats obtenus, voici un bref rappel des différentes étapes du cycle cellulaire eucaryote. Ces étapes permettent, à partir d'une cellule mère, d'obtenir deux cellules filles. La figure 2.15 propose une représentation des différentes étapes.

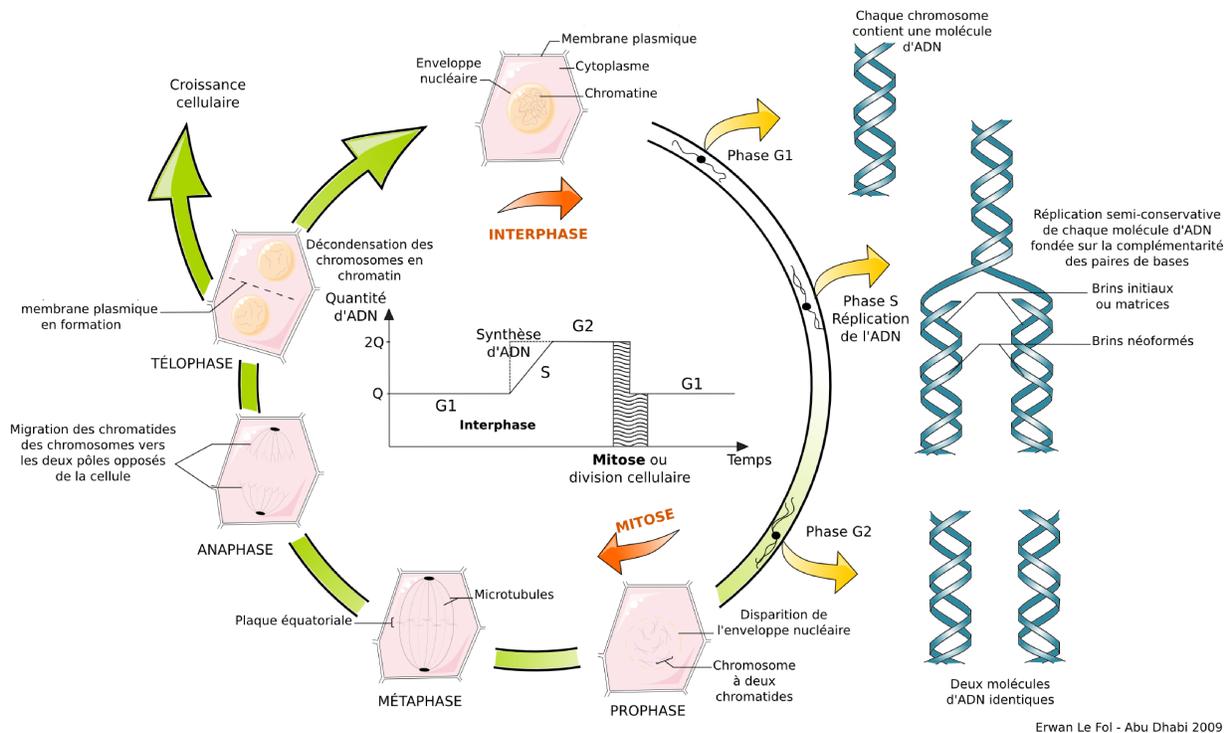


FIGURE 2.15 – Représentation schématisée des différentes étapes du cycle cellulaire chez les eucaryotes et de la quantité d'ADN associée. *Source : <http://www.svt-monde.org>.*

Le cycle cellulaire est constitué de deux parties que sont l'interphase, comprenant les étapes de synthèse de nutriments, transcription des gènes et réplication, et la mitose, étape de division cellulaire permettant de créer deux cellules filles à partir d'une cellule mère unique.

L'interphase est constituée de trois étapes : la phase G1 (pour *gap 1*) lors de laquelle la cellule synthétise et réplique les composants cellulaires autre que l'ADN, la phase S (pour *synthesis*) où il y a doublement de la quantité d'ADN, chaque chromatide étant répliquée, et la phase G2 (pour *gap 2*) étape de vérification de la réplication de l'ADN et de préparation de la cellule en vue de l'entrée en mitose.

Il est intéressant, afin de mieux comprendre le déroulement de ces étapes, de pouvoir obtenir une classification d'une cellule suivant la phase du cycle dans laquelle elle se trouve. Certaines étapes peuvent être étudiées uniquement avec une technique qualitative, les changements morphologiques de la cellule étant suffisamment conséquents. En effet, les

différentes étapes de la mitose sont caractérisées par des modifications de la condensation de la chromatine en chromosomes, une migration des chromosomes au niveau du plan équatorial de la cellule, l'apparition du fuseau mitotique et, enfin, la séparation des chromatides vers les 2 pôles de la cellule. D'autres étapes de l'Interphase sont plus difficiles à déterminer et nécessitent à l'heure actuelle l'utilisation de marqueurs fluorescents pour déterminer la quantité et la localisation d'un élément d'intérêt au sein de la cellule [67, 68]. C'est dans ce cadre que l'imagerie de phase quantitative peut apporter une information supplémentaire en simplifiant le mode opératoire via une suppression du marquage.

### 2.5.2.2 But des études réalisées

Plusieurs études sur cellules et levures ont été réalisées. Tous les résultats ne seront pas présentés dans ce manuscrit. L'idée globale est de montrer à travers quelques exemples que la mesure de masse sèche permet de comparer et de différencier des populations cellulaires dans des phases de croissance différentes ou dans des états où leur quantité de matière est modifiée.

On montrera également comment grâce à des paramètres morphologiques associés aux critères quantitatifs que l'on peut mesurer, une classification des populations non supervisée par l'utilisateur est possible.

Les études porteront essentiellement sur deux types de levures : *Saccharomyces cerevisiae* et *Schizosaccharomyces pombe*. *S.cerevisiae* également appelée levure de bière ou de boulanger en raison des phénomènes de fermentation dont elle est responsable, est très utilisée comme modèle pour l'étude de plusieurs aspects fondamentaux de la biologie cellulaire et moléculaire. C'est aussi le support du premier génome séquencé dans sa totalité en 1996 [69].

Dans notre cas, il est intéressant de prendre les levures comme objets d'étude pour établir les performances de la mesure car elles possèdent un cycle cellulaire court comparé aux cellules de mammifères (de 2 à 3h contre 10 à 24h). On peut ainsi raccourcir le temps d'imagerie et la photo-toxicité des objets étudiés et, à la différence des bactéries qui possèdent également une croissance rapide, ce sont des organismes eucaryotes (*i.e.* organismes possédant un noyau bien délimité ainsi que des organites bien définies comme les mitochondries). En fonction de leur type, leur multiplication peut se faire par bourgeonnement ou par fission, *S. cerevisiae* et *S. pombe* se multipliant respectivement par bourgeonnement et par fission.

L'objet de la première étude porte sur la mise en évidence de différences entre populations en croissance exponentielle et état stationnaire et sera effectuée sur une population de levures *S. cerevisiae* diploïdes. Une étude sur ces mêmes levures mais dans un état haploïde est également réalisée. Les résultats seront mis en Annexe.

On verra comment on peut utiliser ces résultats pour obtenir une classification supervisée et non-supervisée de ces levures.

Une seconde étude impliquant cette fois *S. pombe* sera réalisée afin de voir si l'on peut mettre en évidence des différences entre populations haploïdes de type sexuel différent. Enfin, on étudiera notre capacité à mesurer des taux de croissance de levures *S. pombe* placées dans deux conditions de culture différentes.

### 2.5.2.3 Croissance des cellules et milieux de culture

On sait que lorsque le milieu de culture n'est pas renouvelé, une population cellulaire passe par différentes phases de croissance (voir Figure 2.16). Un milieu pauvre en nutriments va avoir pour effet de placer les cellules dans un état stationnaire où leur croissance et leur prolifération sont ralenties.

D'après la littérature [70], on sait que ce procédé crée un état de pseudo-G0 (état stationnaire) dans la population de cellules.

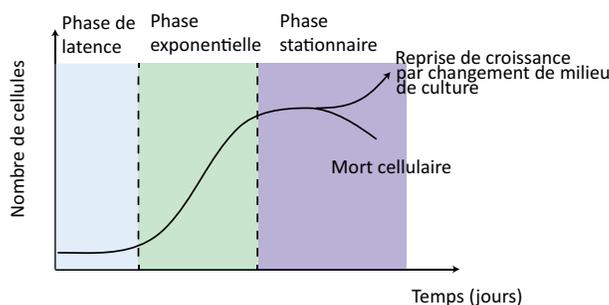


FIGURE 2.16 – Représentation schématique des différentes phases de croissance d'une population cellulaire.

Les levures ont été mises en culture dans un milieu de croissance composé de YPD (pour *yeast extract peptone dextrose*) à 25°C. L'imagerie est réalisée en labtek 2 puits avec environ  $1-2 \cdot 10^5$  cellules par puit.

Pour placer des levures en état stationnaire, on utilise le culot d'un tube à essai contenant des levures placées depuis 3 jours sous agitation. Les nutriments faisant défaut, les levures ne peuvent plus proliférer. Ces levures sont replacées dans un milieu de croissance identique à celui des levures en croissance exponentielle afin de supprimer le biais qui pourrait apparaître avec la différence d'indice de réfraction entre le milieu appauvri et le milieu normal.

### 2.5.2.4 1ère étude : mise en évidence de différences de croissance entre populations en conditions de croissance exponentielle et état stationnaire

**2.5.2.4.1 Croissance de *S. cerevisiae*** Les levures de type *S. cerevisiae* se divisent par bourgeonnement.

Le cycle cellulaire de *S. cerevisiae* (voir Figure 2.17) débute avec l'apparition d'un bourgeon

à la fin de la phase G1, après le point de repère "start". Ensuite, le bourgeon garde une taille constante durant toute la phase S de réplication de l'ADN et croît tout au long de la phase G2 pour atteindre sa dimension finale lorsque la cellule est prête à entrer en mitose (phase M) (Voir Figure 2.17). Le bourgeon grossit au fur et à mesure jusqu'à atteindre une taille critique qui ne dépasse jamais celle de la levure mère au moment de la phase G1/S. La division se fait donc de manière asymétrique et la durée de cycle des levures filles est plus long que celui de la levure mère.

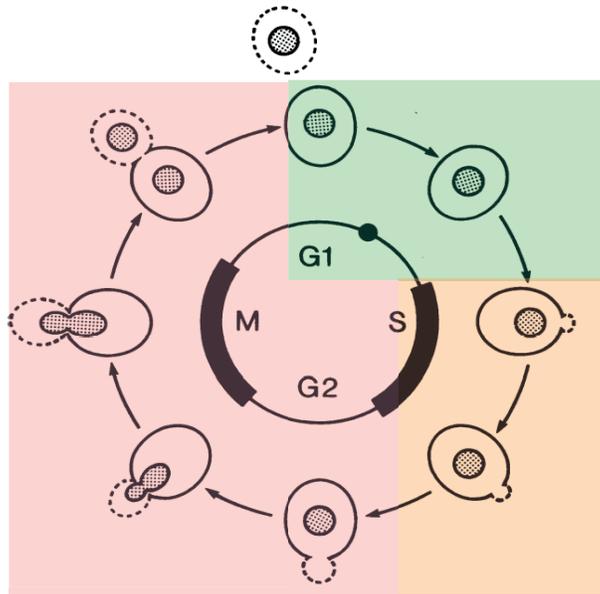


FIGURE 2.17 – Représentation schématique du cycle des levures *S.cerevisiae* [71] Les couleurs font références aux différentes étapes du cycle identifiables grâce à des paramètres morphologiques. La couleur verte correspond à la phase G1 du cycle, la couleur orange à la phase S et la couleur rose aux phases G2 et M.

Nous avons voulu voir d'une part comment évoluait la distribution des différences de volume optique (ou masse sèche) au sein d'une population cellulaire placée dans un état de manque de sérum, assimilable à affamer cette population de cellules et, si d'autre part une mesure de masse sèche et de surface permettrait de mettre en évidence cette différence.

Avant de s'intéresser aux données quantitatives, nous pouvons établir trois catégories de levures au sein d'une population en fonction de la taille du bourgeon qui donne directement une information de la position de la levure au sein du cycle cellulaire comme le montre la Figure 2.17 :

- Levures en phase de pré-bourgeonnement (phase G1, un exemple de ce type de levure est mis en évidence en vert sur la Figure 2.18). Ce sont des levures sans bourgeon qui se trouvent en phase G1 avant le point "start". En toute cohérence, ce

sont les levures présentant une masse sèche moyenne la plus faible.

- Levures en phase de bourgeonnement précoce (phase S, un exemple de ce type de levure est mis en évidence en orange sur la Figure 2.18). Il s'agit là de levures qui sont en phase S avec un petit bourgeon qui garde une taille constante jusqu'à la phase G2. Les bourgeons peuvent être segmentés par notre algorithme en modifiant la taille des objets à considérer mais généralement, on considèrera une entité globale que représente le système [levure + bourgeon]. Ces levures ont une surface et une masse sèche plus importante que les levures en phase G1.
- Levures pleinement bourgeonnantes (phases G2 et M, un exemple de ce type de levure est mis en évidence en rose sur la Figure 2.18). Le bourgeon a grossi, il est toujours relié à la levure mère qui se trouve en phase [G2+M]. Ce sont les levures possédant les plus importantes valeurs de masse sèche.

Si les cellules se trouvent en présence d'une quantité suffisante de nutriments, elles vont chercher à proliférer. On se trouve en présence d'une grande quantité de levures bourgeonnantes. Dans le cas d'une population mise en culture dans un milieu pauvre en nutriments, on sera en présence d'un grand nombre de levures sans bourgeon. Ceci est illustré par les images de la Figure 2.18.

**2.5.2.4.2 Résultats** L'étude est réalisée sur deux échantillons différents constitués respectivement de 434 levures *S. cerevisiae* diploïdes se trouvant en croissance exponentielle et de 303 levures en phase stationnaire. Les levures *S. cerevisiae* seront étudiées sous une forme haploïde et diploïde. Le terme diploïde fait référence au fait que les chromosomes sont présents par paires. Lorsqu'une cellule est haploïde, elle possède un seul exemplaire de chaque chromosome.

Plusieurs dizaines d'images sont acquises sur différents champs de chaque échantillon. Chaque image est ensuite segmentée. Les résultats issus de cette segmentation sont répertoriés dans le Tableau 2.9. On identifie sur les images les 3 catégories de population afin de pouvoir analyser statistiquement différentes grandeurs pour chacune d'entre elles.

Sur la Figure 2.19(a) & (b), on voit qu'il est possible dans l'espace différence de volume optique ou la masse sèche en fonction de la surface 3 principales zones où se répartissent de façon croissante en valeurs de surface et volume optique les cellules en phase G1, S et (G2 + M). Ces résultats sont cohérents avec le fait que les cellules qui bourgeonnent ont une surface plus grande et ont accumulé une quantité plus importante de matière que les cellules sans bourgeon.

En présence de nutriments, les levures se trouvent dans une phase de croissance exponentielle et prolifèrent. Au niveau de l'imagerie de la population à un instant  $t$ , on trouve

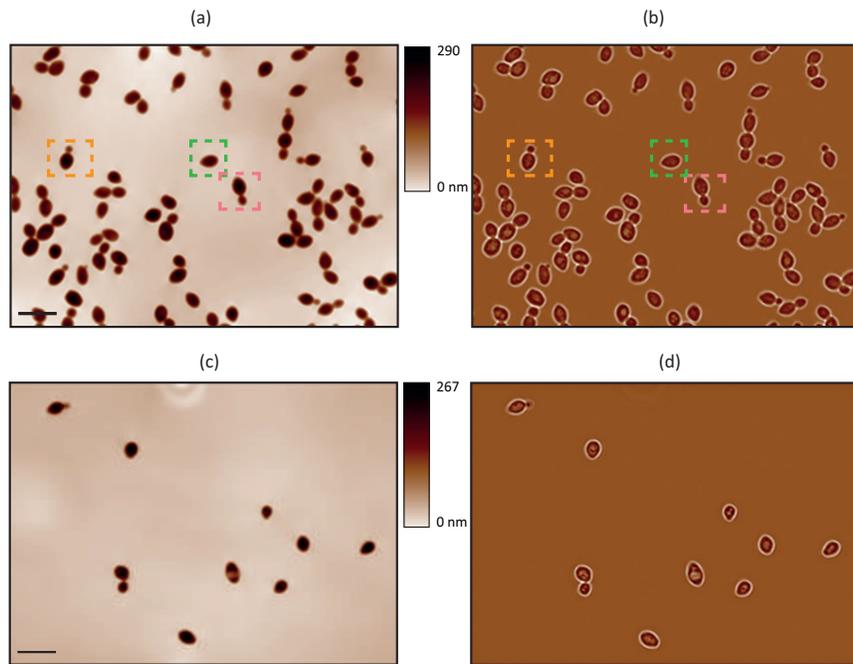


FIGURE 2.18 – Images d’OPD à un temps  $t$  d’une population de levures *S.cerevisiae* en conditions de croissance exponentielle (en haut) et état stationnaire (en bas). (a) & (c) Images brutes, (b) & (d) images filtrées avec un filtrage passe haut. Les 3 types de levures sont mises en évidence grâce à des rectangles en pointillé. Observation avec un objectif  $40\times$ ,  $ON=0,75$  + grandissement supplémentaire  $2\times$ . Échelle :  $10\mu\text{m}$ .

beaucoup de levures bourgeonnant pleinement (phase G2 + M) et peu de levures en phase G1 de pré-bourgeonnement comme on peut le voir sur les Figures 2.18(a), 2.19(a) et 2.20(c).

La moitié de la population se trouve dans un état pleinement bourgeonnant (phases G2 + M) et l’autre moitié comprend des levures avec un petit bourgeon (phase S) ou seules (phase G1).

Lorsque les nutriments font défaut, les levures peuvent rentrer en phase stationnaire durant laquelle elles ne se divisent plus (Figure 2.18(b)), la prolifération pouvant reprendre lorsque les levures sont à nouveau en présence de nutriments. En effet, on voit qu’une grande partie des levures se trouvent en phase de pré-bourgeonnement (voir Figures 2.18(c), 2.19(b) et 2.20(d)).

On voit également qu’il semble y avoir proportionnalité entre masse sèche et surface pour les différentes populations de levures. On calcule un coefficient de détermination  $R^2$  qui nous donne une indication sur le résultat de la régression linéaire effectuée sur les différents points. Ce coefficient vaut 82% pour les levures en croissance exponentielle et 81% pour les levures en phase stationnaire. La dispersion de ces deux séries est la même et le passage d’une croissance exponentielle à un état stationnaire a pour effet d’augmenter la

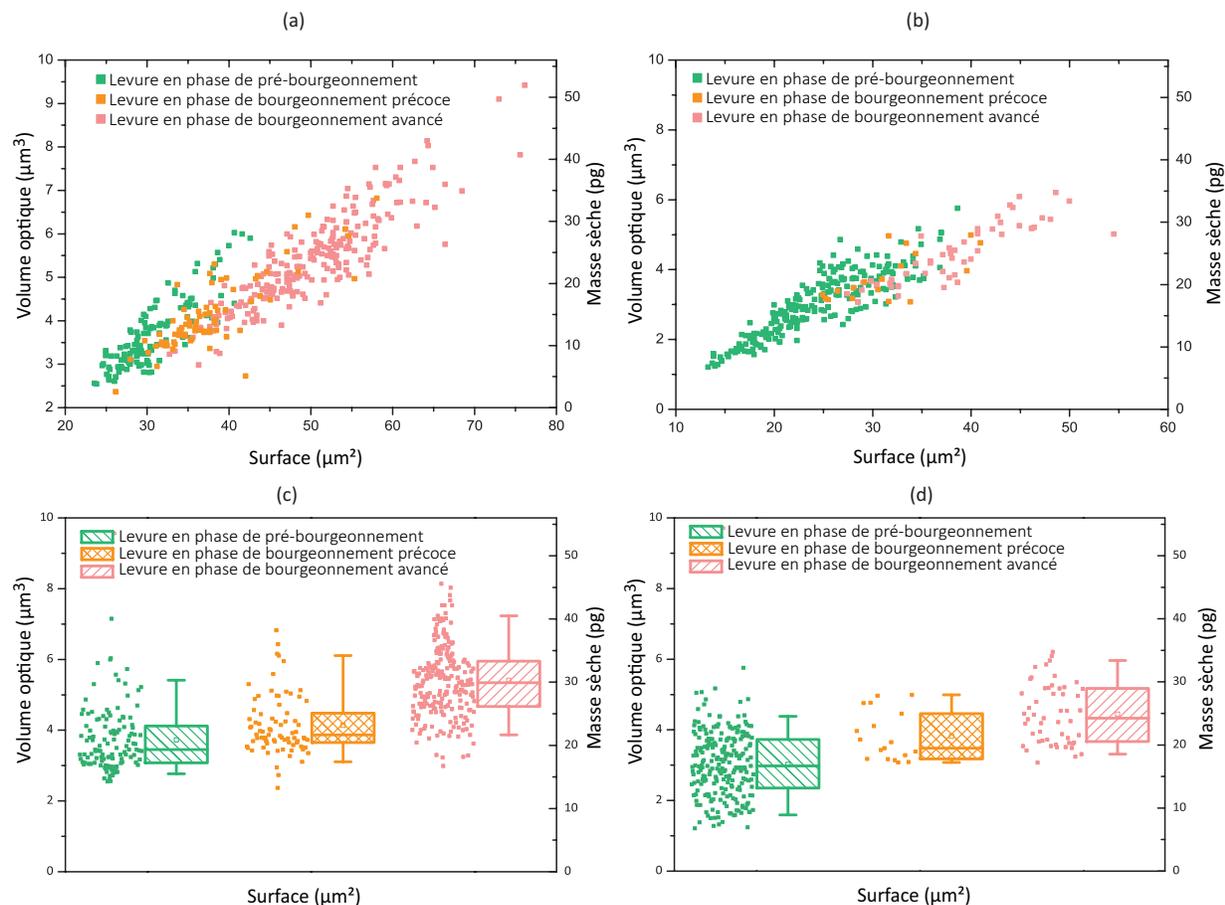


FIGURE 2.19 – Observation de la différence de volume optique/matière sèche en fonction de la surface de chaque levure d’une population diploïde de *S.cerevisiae* en pré-bourgeonnement (*en carrés verts*), en phase de bourgeonnement précoce (*en carrés oranges*) et pleinement bourgeonnantes (*en carrés roses*) (a) en conditions de culture exponentielles et (b) en phase stationnaire. Représentation en diagramme de boîtes à moustaches des populations de *S. cerevisiae* (c) en croissance exponentielle et (d) en phase stationnaire. Les boîtes représentent la médiane (trait central), le premier quartile (bas de la boîte), le dernier quartile (haut de la boîte), la moyenne (carré central), le 5<sup>ème</sup> centile (patte du bas) et le 95<sup>ème</sup> centile (patte du haut) des statistiques sur les différentes expériences. Observation avec un objectif 60 $\times$ , ON=0,75. Source blanche filtrée  $700 \pm 30$  nm.  $3 \cdot 10^6$  cellules/ml.

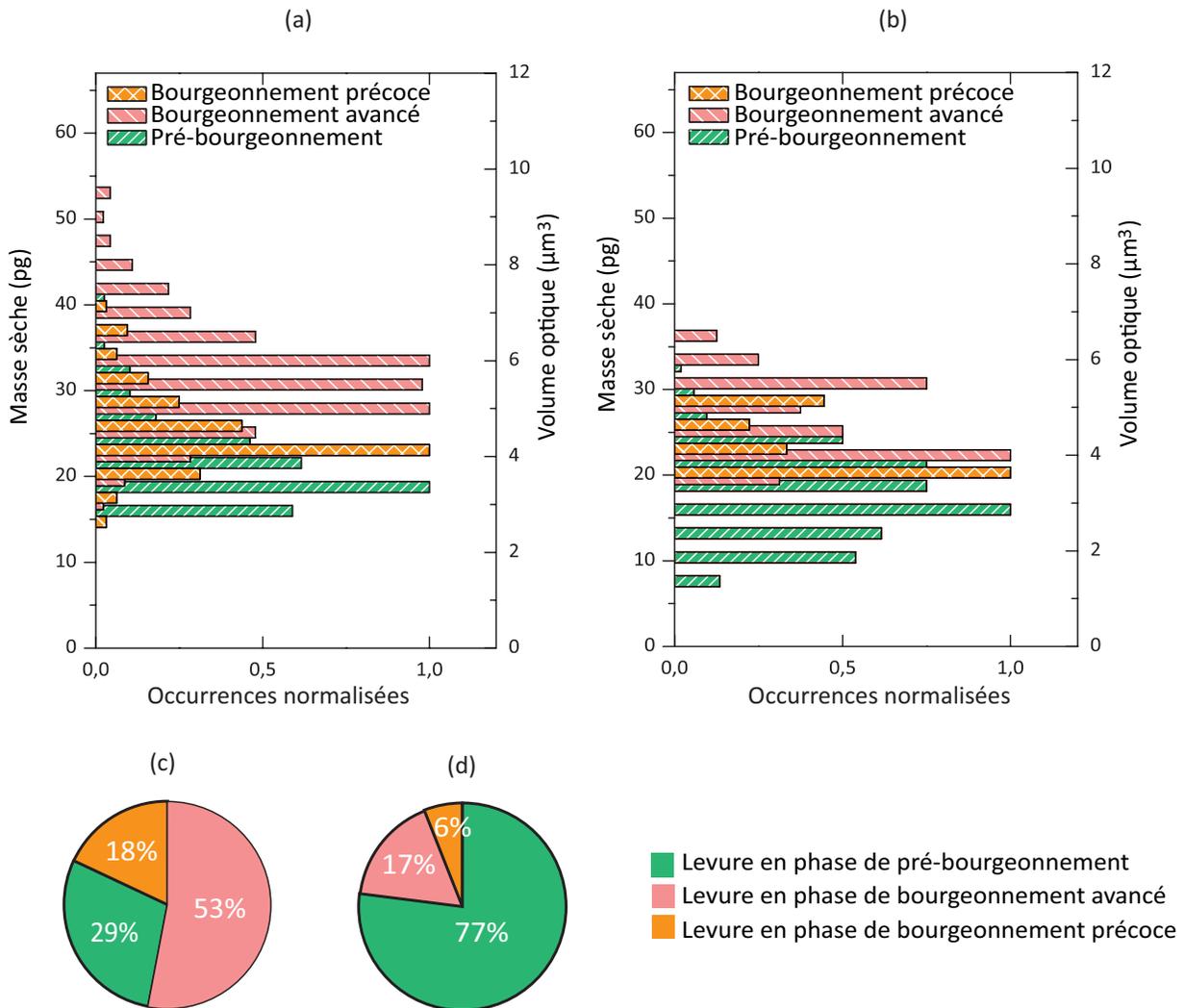


FIGURE 2.20 – Histogramme avec occurrences normalisées des mesures de *S. Cerevisiae* (a) en croissance exponentielle et (b) en état stationnaire. Répartition (c) des 434 levures diploïdes en croissance exponentielle et (d) des 303 levures diploïdes en phase stationnaire en fonction de leur phase au sein du cycle. Observation avec un objectif 60×, ON=0,75. Source blanche filtrée  $700 \pm 30$  nm.  $3 \cdot 10^6$  cellules/ml.

proportion de levures seules dans un cas et de levures avec bourgeon dans l'autre.

Sur la Figure 2.19(a) & (b), on remarque que les levures en phase stationnaire sont très majoritairement (77%) en pré-bourgeoisement contrairement à celles en croissance exponentielle où il y avait une égale répartition entre levures sans bourgeon et avec petit bourgeon d'une part et levures bourgeonnant pleinement d'autre part.

On représente les principaux résultats avec un histogramme et un diagramme en boîte

afin de montrer leur variabilité (Figures 2.19(c) & (d) et 2.20 (a) & (b)). Pour chacune des distributions correspondant aux trois sous-populations identifiées en fonction de la taille du bourgeon de la levure, on calcule la moyenne, la médiane et l'écart type de la série. Au niveau des diagrammes en boîte à moustache, les grandeurs médiane, quartiles et centiles sont représentées.

124 / 232 levures	Levures en phase de pré-bourgeonnement (Phase G1)		
	Surface ( $\mu\text{m}^2$ )	Volume optique ( $\mu\text{m}^3$ )	Masse sèche (pg)
<b>Moyenne</b>	31,1 / 24,4	3,7 / 3,0	20,7 / 16,8
<b>Médiane</b>	30,0 / 24,3	3,4 / 3,0	19,2 / 16,6
<b>Ecart type</b>	5,4 / 5,6	0,9 / 0,9	4,7 / 5,0
78 / 18 levures	Levures en phase de bourgeonnement précoce (phase S)		
	Surface ( $\mu\text{m}^2$ )	Volume optique ( $\mu\text{m}^3$ )	Masse sèche (pg)
<b>Moyenne</b>	37,7 / 31,5	4,1 / 3,8	23,0 / 21,2
<b>Médiane</b>	36,5 / 31,3	3,9 / 3,6	21,5 / 19,8
<b>Ecart type</b>	6,2 / 5,6	0,8 / 0,9	4,6 / 5,0
232 / 53 levures	Levures en phase de bourgeonnement avancé (phase G2 + M)		
	Surface ( $\mu\text{m}^2$ )	Volume optique ( $\mu\text{m}^3$ )	Masse sèche (pg)
<b>Moyenne</b>	50,2 / 38,3	5,4 / 4,4	30,1 / 24,7
<b>Médiane</b>	50,2 / 37,9	5,3 / 4,3	29,7 / 24,1
<b>Ecart type</b>	7,6 / 6,3	1,1 / 0,8	6,0 / 4,7

Tableau 2.9 – Synthèse des résultats de la mesure de masse sèche des 3 populations de *S.cerevisiae* diploïdes en phase de croissance exponentielle (noir) et en phase stationnaire (bleu).

On peut identifier les différentes populations de levures correspondant aux différentes classes citées auparavant. Plus de 50% de la population de levures en phase exponentielle se trouve à un stade avancé du cycle, la population est dans une optique de prolifération tandis que pour les levures en phase stationnaire plus de 70% de la population se trouve sans bourgeon.

En appliquant le test de Mann Whitney aux deux populations de levures considérées, on met en évidence une différence significative des valeurs de masse sèche des levures en phase de pré-bourgeonnement et bourgeonnement précoce d'une part, et d'autre part des levures en phase de bourgeonnement précoce et avancé ( $p < 10^{-7}$ ).

Si on se place à une dimension en considérant la valeur de surface ou de masse sèche, il est difficile de pouvoir différencier les sous-populations car elles se recouvrent. Par contre, en passant en deux dimensions, on voit que les domaines sont bien distincts. Ainsi il est important de combiner des mesures morphologiques (surface) et physiologiques (OPD, masse sèche) pour différencier les différents états des cellules.

On verra par la suite qu'une mesure du taux de croissance de levures attestera également de façon quantitative d'une différence de vitesse de croissance des deux populations.

On étudie maintenant le pourcentage de masse occupée par le bourgeon sur la masse totale de la levure et on compare ces données pour les populations de levures diploïdes en phases de croissance exponentielle et stationnaire. Les résultats sont présentés sous forme d'histogramme (Figure 2.21). Comme attendu d'après les observations précédentes, le bourgeon est en moyenne plus gros de 10% pour les levures en phase exponentielle qu'en phase stationnaire attestant du fait que la plupart des levures en croissance exponentielle qui bourgeonnent sont à un stade de croissance plus avancé que les levures en phase stationnaire qui bourgeonnent.

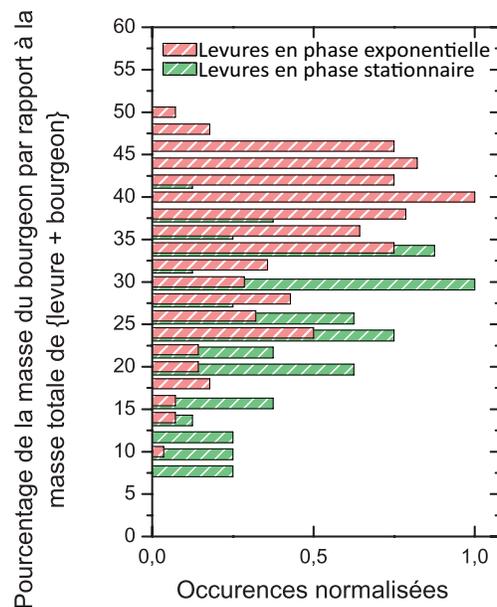


FIGURE 2.21 – Comparaison de la masse occupée par le bourgeon de levures diploïdes dans des conditions de croissance différentes avec occurrences normalisées.

### 2.5.2.4.3 Comparaison des populations diploïdes et haploïdes de levures *S.cerevisiae*

D'après la littérature [69], la masse sèche des levures haploïdes et diploïdes a été évaluée par spectroscopie respectivement à 15 et 20 pg. C'est une masse moyenne mesurée sur des levures sans bourgeon et dans des conditions de croissance exponentielle. Cette différence est due majoritairement au matériel non-génétique, la masse ADN + ARN représentant 1,2 et 1,9 pg [69] pour les espèces haploïdes et diploïdes. Les comparaisons de masse sèche entre levures en état stationnaire et croissance exponentielle sont représentées dans le Tableau 2.10 et entre les levures dans les étapes différentes du cycle dans les états stationnaires et en croissance exponentielle sont présentés dans le Tableau 2.11.

La moyenne de masse sèche des levures haploïdes en considérant les levures en état stationnaire et en croissance exponentielle est de 13,4 pg et 21,8 pg pour les levures diploïdes.

Type	Haploïde		Diploïde	
Phase	Stationnaire	Exponentielle	Stationnaire	Exponentielle
Pré-bourgeoisement	10,7	10,1	16,6	19,2
Bourgeoisement précoce	12,7	11,6	19,8	21,5
Bourgeoisement avancé	17,4	17,7	24,1	29,7

Tableau 2.10 – Médiane des mesures de masse sèche en pg des différents types de levures étudiés.

Les valeurs sont très proches de celles citées comme référence de 15 et 20 pg [69], valeurs moyennes mesurées par des techniques spectroscopiques, ce qui atteste du bon accord de notre mesure.

La différence de masse sèche entre levures haploïdes et diploïdes de chaque population est, selon [69], de 5 pg. En phase stationnaire, on trouve une différence de 6,5 pg en moyenne et de 10,3 en phase exponentielle. On peut supposer que les mesures spectroscopiques ont été effectuées sur une population de levures en phase stationnaire, ce qui peut arriver quand les levures arrivent à confluence. Les levures diploïdes sont beaucoup plus grosses en phase exponentielle que stationnaire, ce qui explique la différence de masse sèche plus importante dans ce cas entre haploïdes et diploïdes.

En conclusion, la mesure de masse sèche nous a permis de faire la différence entre levures haploïdes et diploïdes mais également de réaliser une classification et de définir des sous-groupes au sein même de ces 2 populations dans les cas de croissances différentes.

	Masse sèche (pg)		
Stationnaire	<b>Pré bourgeoisement</b>	<b>Bourgeoisement précoce</b>	<b>Bourgeoisement avancé</b>
Haploïdes	10,7	12,7	17,4
Diploïdes	16,6	19,8	24,1
$\Delta m$ (pg)	<b>5,9</b>	<b>7,1</b>	<b>6,6</b>
Exponentielle			
Haploïdes	10,1	11,6	17,7
Diploïdes	19,2	21,5	29,7
$\Delta m$ (pg)	<b>9,0</b>	<b>9,9</b>	<b>12,0</b>

Tableau 2.11 – Synthèse des résultats de la mesure de masse sèche de *S.cerevisiae*

### 2.5.2.5 Étude de populations de *S.pombe*

Une autre espèce de levure a été étudiée : *S. pombe*, aussi appelée *levure à fission*. Le but de cette étude est de voir si des différences significatives peuvent être mises en évidence entre des populations haploïdes de type sexuel différent  $h^+$  et  $h^-$ . On sait que ces levures diffèrent uniquement par une légère modification génétique au sein de leur chromosome II. En théorie, il ne doit pas être possible de les différencier étant donné la résolution en terme de masse sèche mesurée qui a été établie dans la partie caractérisation. En effet, la quantité d'ADN totale d'une levure équivaut à 0,017 pg [69].

Les levures de cette espèce sont cylindriques et mesurent généralement quelques  $\mu\text{m}$  de longueur (Figure 2.22). Les cellules maintiennent leur forme allongée tout au long du cycle et croissent par leurs extrémités. La division s'effectue par séparation de la levure initiale en deux levures filles de taille égale après apparition d'un septum au centre de la levure mère [72]. *S. pombe* possède trois chromosomes et une phase G2 très longue.

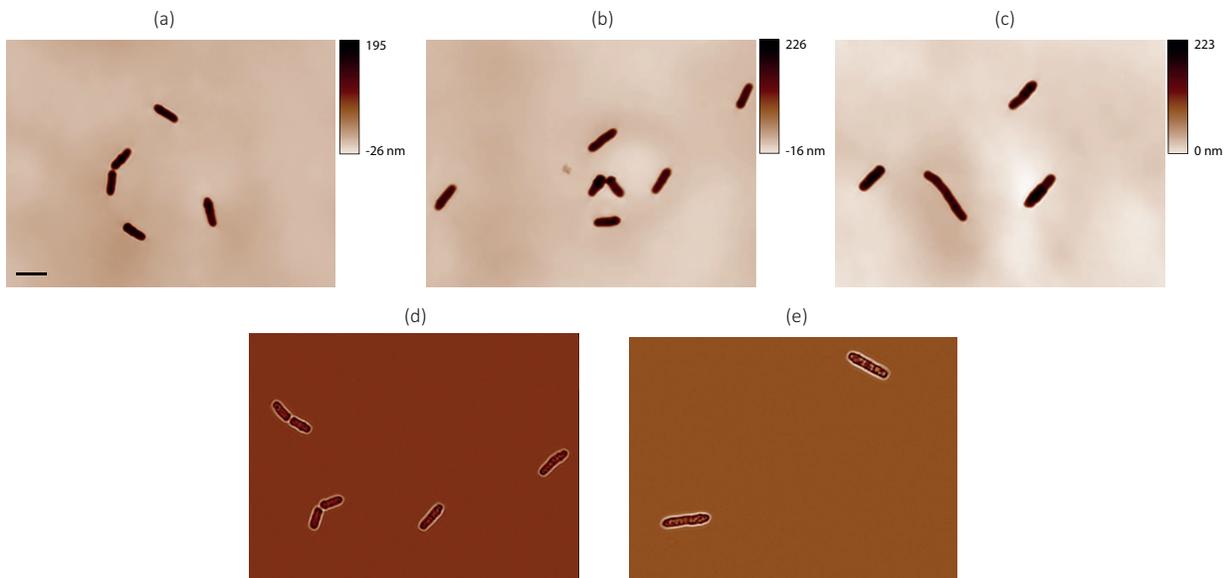


FIGURE 2.22 – OPD de levures *S.pombe* (a) haploïdes de type  $h^+$ , (b) haploïdes de type  $h^-$ , (c) diploïdes. OPD filtrée à l'aide d'un filtrage passe haut dans l'espace de Fourier pour mettre en évidence les détails des levures imagées (d) haploïdes de type  $h^+$  et (e) diploïdes. L'échelle représente  $20\mu\text{m}$  sur l'image. Observation et imagerie avec un objectif à air de grandissement  $60\times$ ,  $\text{ON}=0,75$ .

Contrairement à l'espèce *S. cerevisiae*, il n'est pas possible d'identifier les différentes étapes du cycle de *S. pombe* grâce à une information morphologique (voir Figure 2.23). On ne peut identifier que le début de croissance entre les phases G1 et S en contrôlant la taille de la levure et l'apparition du septum signe de fin de mitose et visualisable grâce à

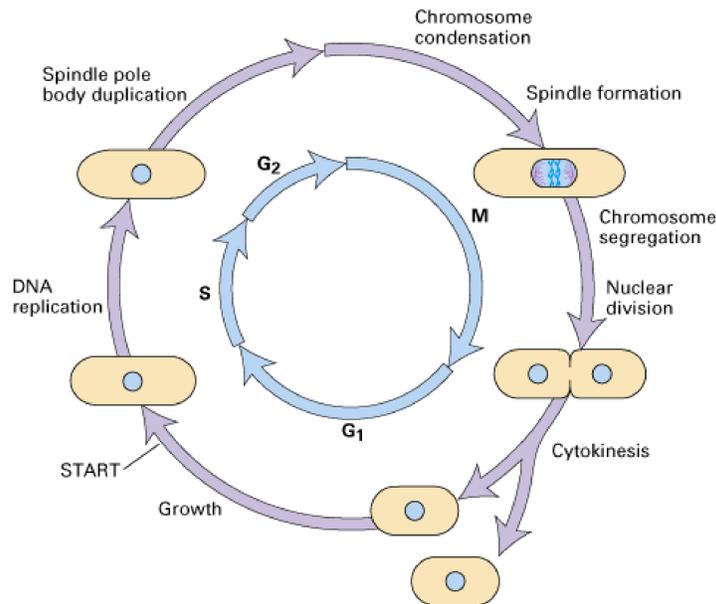


FIGURE 2.23 – Représentation schématisée du cycle cellulaire de levures de type *S.pombe* avec mise en évidence des différentes étapes. Source : <http://www.pha.jhu.edu>

un filtrage passe haut des images (voir Figure 2.22(d)).

Une classification utilisant un critère de forme n'étant pas possible, on s'appuiera principalement sur les différences de masse sèche et de surface pour réaliser une comparaison quantitative de deux formes haploïdes de  $h^+$  et  $h^-$  et d'une forme diploïde de *S.pombe*.

On dispose de trois populations différentes de levures : deux échantillons où les levures sont dans un état haploïde de type sexuel différent et un échantillon où les levures sont dans un état diploïde.

Des mesures de surface et de différence de volume optique de populations de plusieurs centaines de levures issues de la segmentation de plusieurs dizaines d'images d'OPD sont réalisées sur chacun de ces trois échantillons.

On représente les résultats au sein d'un graphique représentant le volume optique et la masse sèche mesurés en fonction de la surface de la levure (voir Figure 2.24(a)). On voit que les 2 nuages de points correspondant aux espèces haploïdes  $h^+$  et  $h^-$  se recouvrent en très grande partie. Ceci atteste du fait que ces espèces sont très proches du point de vue des paramètres étudiés (les médianes de leur valeur de masse sèche valent  $28,8 \pm 8,9$  pg pour le type  $h^+$  et  $28,5 \pm 6,8$  pg pour les  $h^-$ ) et qu'elles ne semblent pas pouvoir être distinguées grâce au critère de masse sèche seul (voir Tableau 2.12, Histogramme figure 2.24(b) et Figure 2.24(c)).

La masse sèche moyenne des levures diploïdes vaut près de 2 fois celle des levures

haploïdes, ce qui correspond à ce qui était attendu d'après la taille des levures des images d'OPD de la Figure 2.22.

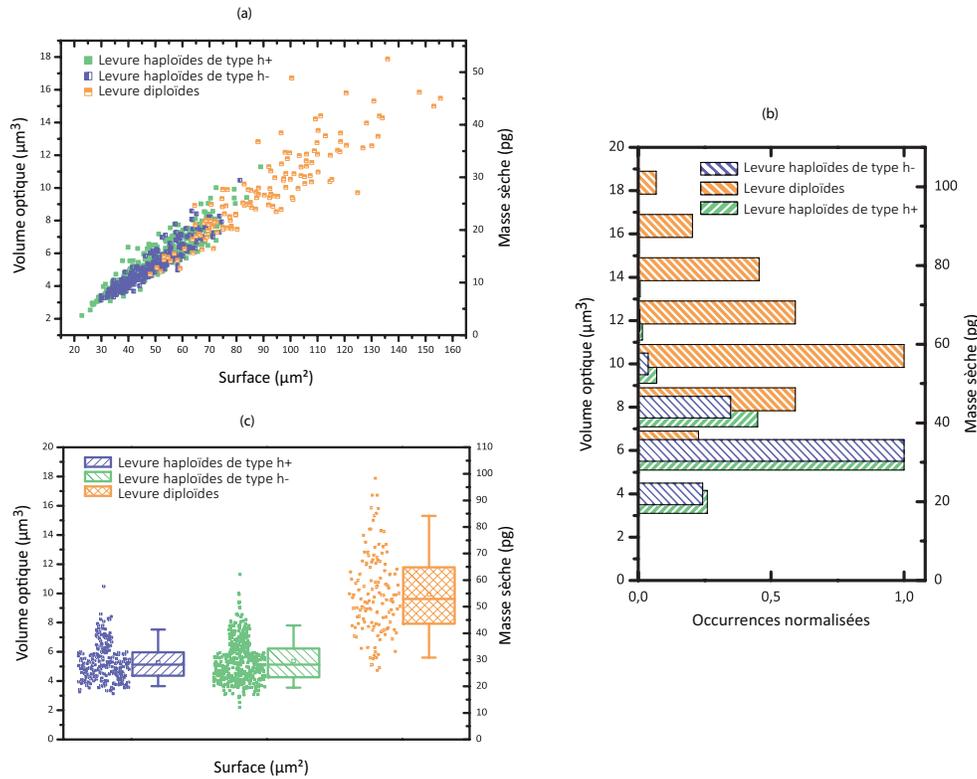


FIGURE 2.24 – (a) Répartition de la différence de volume optique/matière sèche en fonction de la surface de chaque levure de 3 populations de *S.pombe* haploïdes de type h+ (*en carrés verts*), de type h- (*en carrés violets*) et diploïdes (*en carrés oranges avec bande horizontale blanche*) en conditions de culture exponentielles. (b) Histogramme des mesures de masse sèche de *S. Pombe* haploïdes et diploïde en conditions de croissance exponentielle avec occurrences normalisées. (c) Représentation en diagramme de boîtes à moustaches des populations de *S.pombe* haploïdes et diploïde en croissance exponentielle. Les boîtes représentent la médiane (trait centrale), le premier quartile (bas de la boîte), le dernier quartile (haut de la boîte), la moyenne (carré central), le 5<sup>ème</sup> centile (patte du bas) et le 95<sup>ème</sup> centile (patte du haut) des statistiques sur les différentes expériences. Observation et imagerie avec un objectif à air. Grandissement total 60 $\times$ , ON=0,75. Source blanche filtrée  $\lambda=700 \pm 30$  nm.

Le résultat du test statistique de Mann Whitney ( $p=0,18$ ) confirme la tendance visible sur les Figures 2.24(a) et 2.24(b) : on ne peut pas, grâce à une simple mesure de masse sèche, différencier les 2 populations haploïdes h+ et h- de levures. Ceci est cohérent avec le fait que la différence entre ces 2 populations est faible. En effet, on sait qu'elles diffèrent seulement par une petite partie de leur chromosome II. Ce chromosome fait  $4,6 \cdot 10^6$  paires de bases (pb), ce qui correspond à une masse totale de 4,7 fg (on utilise la correspondance

466 levures	Levures haploïdes de type h+		
	Surface ( $\mu\text{m}^2$ )	Volume optique ( $\mu\text{m}^3$ )	Masse sèche (pg)
<b>Moyenne</b>	49,3	5,5	30,3
<b>Médiane</b>	46,9	5,2	28,8
<b>Ecart type</b>	13,5	1,6	8,9
263 levures	Levures haploïdes de type h-		
	Surface ( $\mu\text{m}^2$ )	Volume optique ( $\mu\text{m}^3$ )	Masse sèche (pg)
<b>Moyenne</b>	49,0	5,3	29,3
<b>Médiane</b>	48,6	5,1	28,5
<b>Ecart type</b>	10,2	1,2	6,8
138 levures	Levures diploïdes		
	Surface ( $\mu\text{m}^2$ )	Volume optique ( $\mu\text{m}^3$ )	Masse sèche (pg)
<b>Moyenne</b>	90,9	9,9	55,1
<b>Médiane</b>	89,3	9,6	53,5
<b>Ecart type</b>	22,5	2,7	15,2

Tableau 2.12 – Synthèse des résultats de la mesure de masse sèche des 3 types de levures *S.pombe* en phase de croissance exponentielle.

1 pg = 978 Mpb). Même dans le cas où tout ce chromosome serait modifié, on voit que cette valeur est en deçà de la résolution calculée précédemment en terme de différence de masse sèche mesurable correspondant à 42 fg (0,14% de 30 pg). De plus, cette partie du chromosome ne code pas pour des protéines et par conséquent sa suppression n'engendre pas un défaut de protéine qui pourrait représenter une différence de masse quantifiable par rapport à l'autre espèce haploïde. Il n'est donc pas surprenant que l'on ne puisse pas différencier ces deux espèces par une mesure de masse sèche.

Un test identique utilisé pour comparer populations haploïdes et diploïdes permet d'affirmer que les différences en terme de masse sèche sont significatives et que l'on est en mesure de discriminer ces 2 populations.

On a vu que pour les levures de type *S. cerevisiae*, la division se fait de manière asymétrique avec un bourgeon toujours plus petit que la levure mère avant la séparation complète des deux levures. Cette division paraît plus symétrique pour *S. pombe* qui se divise par fission au niveau du centre de la levure mère. Cependant, une légère asymétrie en terme de quantité de matière sèche peut être mesurée en étudiant chaque couple constitué par les 2 levures issues d'une même levure mère initiale. On représente le rapport de la plus grande sur la plus petite masse des 2 levures du couple de levures filles. Les résultats sont présentés dans le Tableau 2.13. On peut en conclure que la division se fait toujours de façon asymétrique et dans les mêmes proportions pour les 3 types de levures étudiées.

Ce phénomène a également été mesuré dans le cadre d'une étude sur les cellules HeLa qui ne sera pas présentée dans ce manuscrit. La mesure de la répartition de masse sèche entre les deux cellules a permis de montrer l'asymétrie de cette dernière. La cellule de masse moyenne 685 pg se divise en deux cellules filles de masses moyennes 368 pg et 313 pg, ce qui représente respectivement 54 et 46 % de la masse sèche de la cellule mère. On peut calculer le rapport de la masse sèche la plus faible sur la plus forte, égal à 0,85. Il est intéressant de noter qu'il est très proche de celui trouvé pour les levures.

On constate que la division cellulaire n'est pas symétrique contrairement à ce qui est habituellement décrit en biologie lors de l'illustration de la division. En réalité, il a été démontré depuis longtemps que les deux cellules générées de la mitose d'une cellule initiale sont différentes du point de vue de leur contenu protéique [73, 74], de leurs dimensions ou encore de leur potentiel de développement [75, 76].

En effet, certains constituants cellulaires ne sont pas répartis de façon égale entre les deux cellules. Cette asymétrie a été étudiée d'un point de vue génétique sur les levures *S. cerevisiae* [77, 78] et sur les cellules souches où il apparaît que cette asymétrie pourrait avoir une influence sur le destin en terme de fonctionnalités et de viabilité de la cellule. Le rôle exact de cette asymétrie reste encore à étudier et la pertinence d'une mesure de masse réalisée sur des populations cellulaires en division est ici évidente.

Type de cellule	masse sèche <sub>min</sub> (pg)	masse sèche <sub>max</sub> (pg)	masse sèche <sub>min</sub> / masse sèche <sub>max</sub>
120 couples de levures haploïdes de type h+	23,9 (46,5 %)	27,5 (55,5 %)	0,88 ± 0,10
67 couples de levures haploïdes de type h-	24,2 (46,6 %)	27,9 (53,4 %)	0,88 ± 0,09
17 couples de levures diploïdes	48,1 (48,7 %)	55,9 (51,3 %)	0,88 ± 0,08

Tableau 2.13 – Synthèse des résultats de comparaison des couples de levures filles de populations de *S.pombe* haploïdes et diploïdes en conditions de culture exponentielles.

### 2.5.3 La mesure de masse sèche comme outil de classification d'une population cellulaire

La classification est une technique mathématique qui permet de classer divers objets dans un nombre fini de catégories de manière automatique. Elle nécessite une phase d'apprentissage sur des échantillons type avant de pouvoir s'attaquer à des échantillons arbitraires non connus. L'apprentissage peut être soit supervisé si l'intervention d'un opérateur définit les catégories soit non supervisé si c'est l'algorithme qui détermine le nombre et les

caractéristiques des catégories. L'apprentissage supervisé est plus proche d'un comportement humain. L'apprentissage non supervisé est plus complexe mais permet de "découvrir" des catégories sans connaissance préalable.

Ici, l'ensemble de données est représenté par un tableau de cellules avec pour chacune de ces cellules différents paramètres morphologiques calculés à partir de la segmentation.

Le but est de réussir à partitionner cet ensemble en plusieurs groupes tels que les cellules de chaque groupe contenues à l'intérieur soient les plus semblables possible au vu des paramètres considérés, et que les différents groupes soient les plus différenciables entre eux afin que les critères considérés soient réellement significatifs et permettent de discriminer des cellules entre elles.

On comparera dans cette étude deux types de classification (*i.e.* supervisée et non supervisée) basées sur l'algorithme des k-moyens [79]. Cette méthode, très utilisée dès qu'il s'agit de faire des statistiques descriptives sur de grands échantillons a l'avantage d'être efficace et très rapide. C'est une méthode dont le but est de diviser un échantillon en k partitions, la classification se fait sur la base du critère des plus proches voisins. On veut minimiser la distance entre les points à l'intérieur de chaque partition, chaque point étant affecté à la partition dont le centre de gravité est le plus proche.

Pour réaliser une classification supervisée, on cherchera à minimiser la distance de chacun des éléments à une droite frontière qui séparera les différentes populations préalablement identifiées.

### **2.5.3.1 Résultats de la classification utilisée sur une population de levures *S.cerevisiae* diploïdes en croissance exponentielle**

On essaye de classifier les 3 types de populations de levures *S. cerevisiae* en croissance exponentielle évoqués dans l'étude précédente grâce à nos algorithmes avec et sans supervision.

Dans le cas d'une classification supervisée, les 3 populations sont identifiées au préalable par l'utilisateur. On peut comparer de cette façon le résultat des deux classifications et évaluer graphiquement les erreurs de classification.

Les résultats obtenus sont regroupés dans les Tableaux 2.15 et 2.14 et illustrés Figure 2.25.

L'appréciation de la classification est réalisée en comptabilisant les levures correctement affectées à un type et les erreurs de classification.

Dans ce cadre, on introduit les notions de *faux positif* et *faux négatif*. On parle de faux positif (test positif à tort) ou de faux négatif (test négatif à tort) quand le résultat d'un test est contraire à la réalité (ici à la classification réalisée par l'utilisateur). Dans notre cas, on réalise un test pour chacune des levures que l'on veut classifier.

Sur les 124 levures en pré-bourgeonnement, 94% ont été correctement identifiées, les autres 6% ont été classées dans la catégorie levures en bourgeonnement précoce. Pour les 78

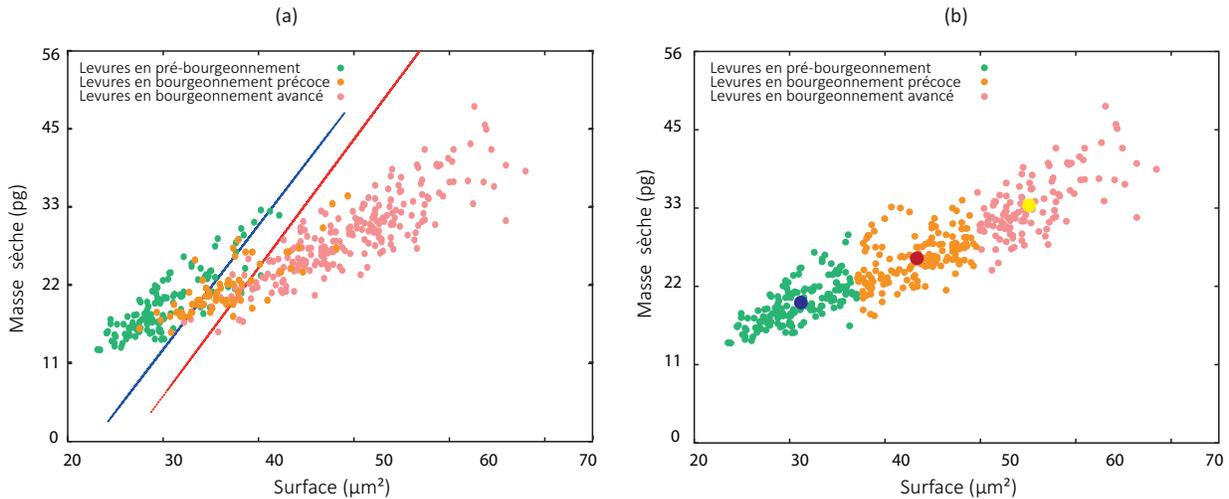


FIGURE 2.25 – Résultat de la partition de la population étudiée plus haut de levures *S. cerevisiae* diploïde en croissance exponentielle (a) non supervisée et (b) supervisée.

levures en bourgeoisement précoce, on recense 60% d'identifications réussies, 27% de faux négatifs classés dans la catégorie levures en pré-bourgeoisement et 13% dans la catégorie levures en bourgeoisement avancé. Enfin, pour les 232 levures en bourgeoisement avancé, 94% des identifications sont correctes avec 6% de faux négatifs classés dans la catégorie bourgeoisement précoce.

On compte ainsi 85% de vrais positifs en ce qui concerne la classification des levures suivant les zones déterminés par l'algorithme et 15% de faux positifs constitués par des levures en bourgeoisement précoce.

En ce qui concerne la zone de bourgeoisement précoce, on compte 10% de faux positifs constitués de levures en pré-bourgeoisement et 22% de levures en bourgeoisement avancé. C'est la zone qui compte le plus de faux positifs.

La zone de bourgeoisement avancé compte 93% de vrais positifs et 7% de faux positifs constitués par des levures en bourgeoisement précoce.

En conclusion, la classification supervisée donne de très bons résultats quant à l'identification des levures en pré bourgeoisement et en bourgeoisement avancé avec respectivement 94% et 85% d'identification correcte. Par contre, la population en bourgeoisement précoce est difficilement identifiée avec 60% d'identification correcte.

Analysons maintenant les résultats de la classification non supervisée. Pour les levures en pré-bourgeoisement, on a 79% d'identification correcte et 20% de faux positifs classés dans la catégorie levures en bourgeoisement précoce et 1% de faux positifs classés dans la catégorie levures en bourgeoisement avancé. Pour les levures en bourgeoisement précoce, on identifie correctement 13% des levures avec 5% de faux négatifs classés dans la caté-

Etat de la levure \ Zone	Pré-bourgeons	Bourgeons précoces	Bourgeons avancés
Pré-bourgeoisement	95 (80%)	24 (19%)	1 (1%)
Bourgeoisement précoce	8 (5%)	19 (13%)	127 (82%)
Bourgeoisement avancé	0	0	160 (100%)

Tableau 2.14 – Synthèse des résultats de la classification non supervisée des trois populations de *S.cerevisiae* diploïde en croissance exponentielle.

Etat de la levure \ Zone	Pré-bourgeons	Bourgeons précoces	Bourgeons avancés
Pré-bourgeoisement	117 (96%)	7 (6%)	0
Bourgeoisement précoce	21 (27%)	47 (60%)	10 (13%)
Bourgeoisement avancé	0	15 (6%)	217 (94%)

Tableau 2.15 – Synthèse des résultats de la classification supervisée des trois populations de *S.cerevisiae* diploïde en croissance exponentielle.

gorie levures en pré-bourgeoisement et 82% dans la catégorie levures en bourgeoisement avancé. Enfin, pour les levures en bourgeoisement avancé, 100% des identifications sont correctes.

En ce qui concerne les différentes zones définies par l'algorithme, 92% des levures classés en zone de pré-bourgeoisement sont effectivement des levures en pré-bourgeoisement et on compte 8% de faux positifs constitués par des levures en bourgeoisement précoce.

Seulement 44% des levures classées en zone de bourgeoisement précoce se révèlent être bien identifiées, 56% de faux positifs étant répartis entre une majorité de levures en bourgeoisement avancé (43%) et des levures en pré-bourgeoisement (8%).

La dernière zone est constituée de 56% de vrais positifs, 43% de faux positifs qui sont des levures en bourgeoisement précoce et 1% en pré-bourgeoisement.

La technique supervisée permet de classifier correctement les levures en pré-bourgeoisement et les levures en bourgeoisement avancé avec respectivement 96% et 94% des levures correctement identifiées. En ce qui concerne les levures en bourgeoisement précoce, elles ne sont correctement classifiées qu'à 60%.

La classification non supervisée permet de classifier à 80% les levures en pré-bourgeoisement. En ce qui concerne les 2 autres types de levures, la classification ne permet pas d'identifier correctement les levures en bourgeoisement avancé qui sont considérées majoritairement comme des levures en bourgeoisement précoce.

La conclusion de cette étude est que la classification non supervisée donne des résultats moins fiables en ce qui concerne les populations en bourgeoisement précoce avec près de 13% seulement d'identification correcte.

Etat de la levure \ Zone	Avec Bourgeon	Sans Bourgeon
Avec Bourgeon	173 (84%)	33 (16%)
Sans Bourgeon	9 (10%)	81 (90%)

Tableau 2.16 – Synthèse des résultats de la classification non supervisée des populations de *S.cerevisiae* diploïde en croissance exponentielle avec et sans bourgeon.

Les deux paramètres choisis pour réaliser cette classification ne permettent donc pas de séparer suffisamment les 3 populations. Il s’agit maintenant de considérer d’autres paramètres plus significatifs pour effectuer cette classification.

**2.5.3.1.1 Utilisation de paramètres supplémentaires** Dans le cadre de l’étude précédente sur la mesure de masse sèche des levures, on a pu constater que l’élément qui variait le plus au cours du cycle cellulaire entre les 3 populations était sa surface projetée. Lorsque la levure bourgeonne, de circulaire sa forme devient elliptique. Évidemment, cela suppose que le bourgeon soit visible dans l’image. Si le bourgeon est hors focus, il faudra combiner ce paramètre avec celui de la masse sèche pour différencier cette levure d’une levure sans bourgeon. Plus le bourgeon grossit et plus l’ellipticité de la levure (*i.e.* 1 moins le rapport entre la longueur de l’axe majeur sur l’axe mineur de l’ellipse) devient prononcée. Ce paramètre doit ainsi nous permettre de faire la différence entre levures sans et avec bourgeons.

Pour séparer les deux populations avec bourgeons, on étudie le paramètre de circularité  $\mathcal{C}$  de l’objet défini en faisant intervenir le périmètre  $\mathcal{P}$  et l’aire  $\mathcal{A}$  de l’objet grâce à la relation :  $\mathcal{C} = 4\pi\mathcal{A}/\mathcal{P}^2$ . Plus le bourgeon est gros et moins le caractère circulaire est important. La figure 2.26 présente la répartition des 3 sous-populations en fonction de ces nouveaux paramètres.

On utilise une représentation en trois dimensions représentant l’ellipticité et la circularité en fonction de la surface (voir Figure 2.26(a) & (b)) afin de mettre en évidence la possible séparation des populations dans l’espace des critères en fonction du volume optique et de la surface. On utilise l’algorithme non supervisé pour réaliser une classification en deux étapes des 3 populations.

On réalise la classification non supervisée des levures en 2 populations en fonction du critère avec/sans bourgeon. Les résultats de la classification sont représentés Figure 2.27(a) & (b) et Tableau 2.16.

En conclusion, 84% des levures sans bourgeon et 90% des levures avec bourgeon ont été correctement identifiées.

Le taux de faux négatifs est de 30% pour les levures sans bourgeon et de 5% pour les levures avec bourgeon.

On classe ensuite les populations avec bourgeon en fonction du critère de circularité afin de séparer les levures en phase S et celles en phase (G2+M). Les résultats de la classification sont représentés Figure 2.27(d) et Tableau 2.17.

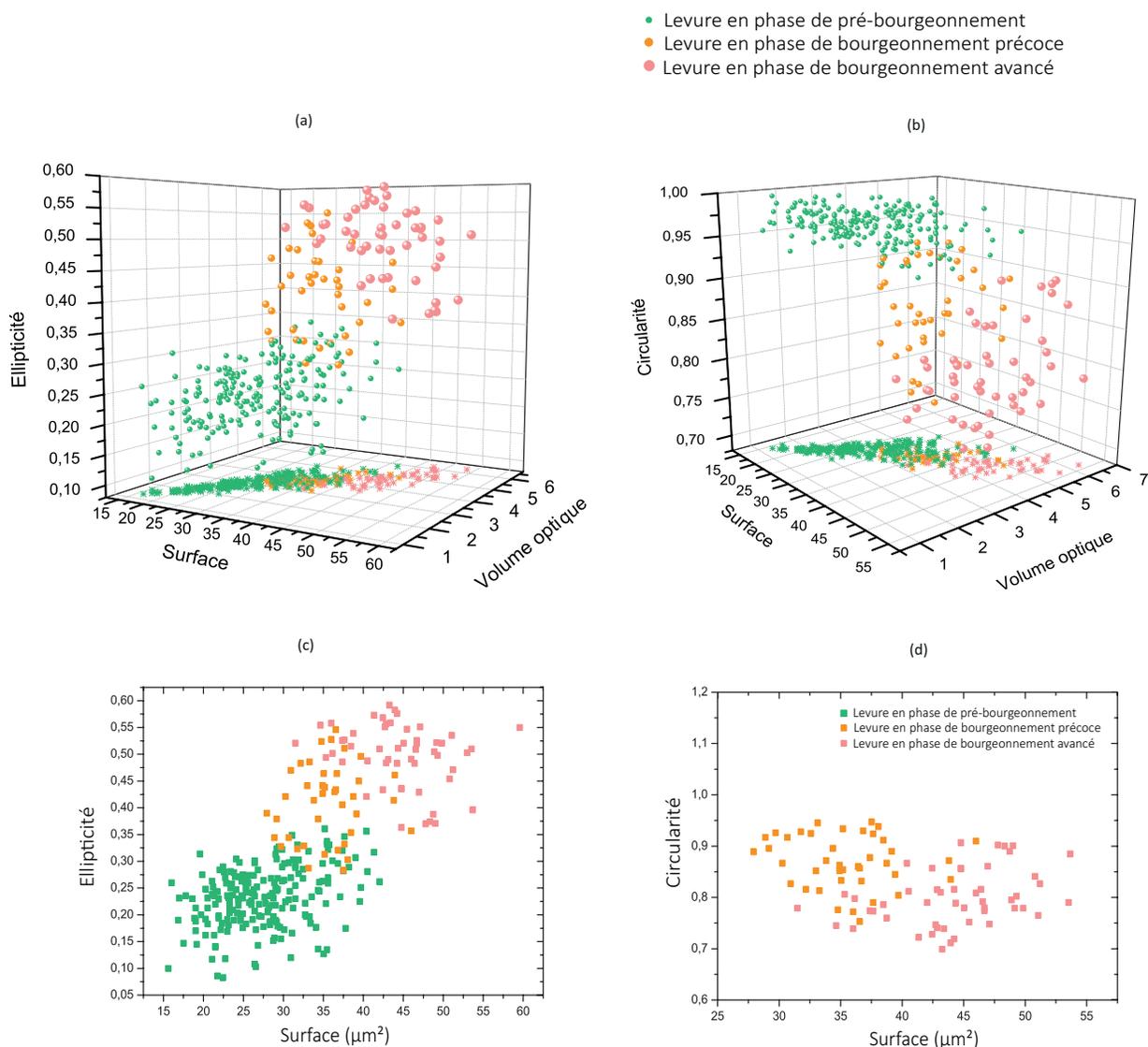


FIGURE 2.26 – Représentation graphique en 3 dimensions de la population de *S. cerevisiae* diploïde en croissance exponentielle en fonction des paramètres surface, volume optique et (a) ellipticité et (b) circularité. Représentation en 2 dimensions des paramètres ellipticité (c) et circularité (d) en fonction de la surface.

La classification non supervisée des 2 populations avec bourgeon a permis d'identifier correctement 94% des levures avec petit bourgeon et 91% des levures avec gros bourgeon. Le taux de faux négatifs est de 9% pour les levures avec petit bourgeon et de 19% pour les levures avec gros bourgeon.

En conclusion, l'introduction de nouveaux paramètres permet de réaliser une classification correcte non supervisée pour 84% pour les levures en pré-bourgeoisement, 94% pour

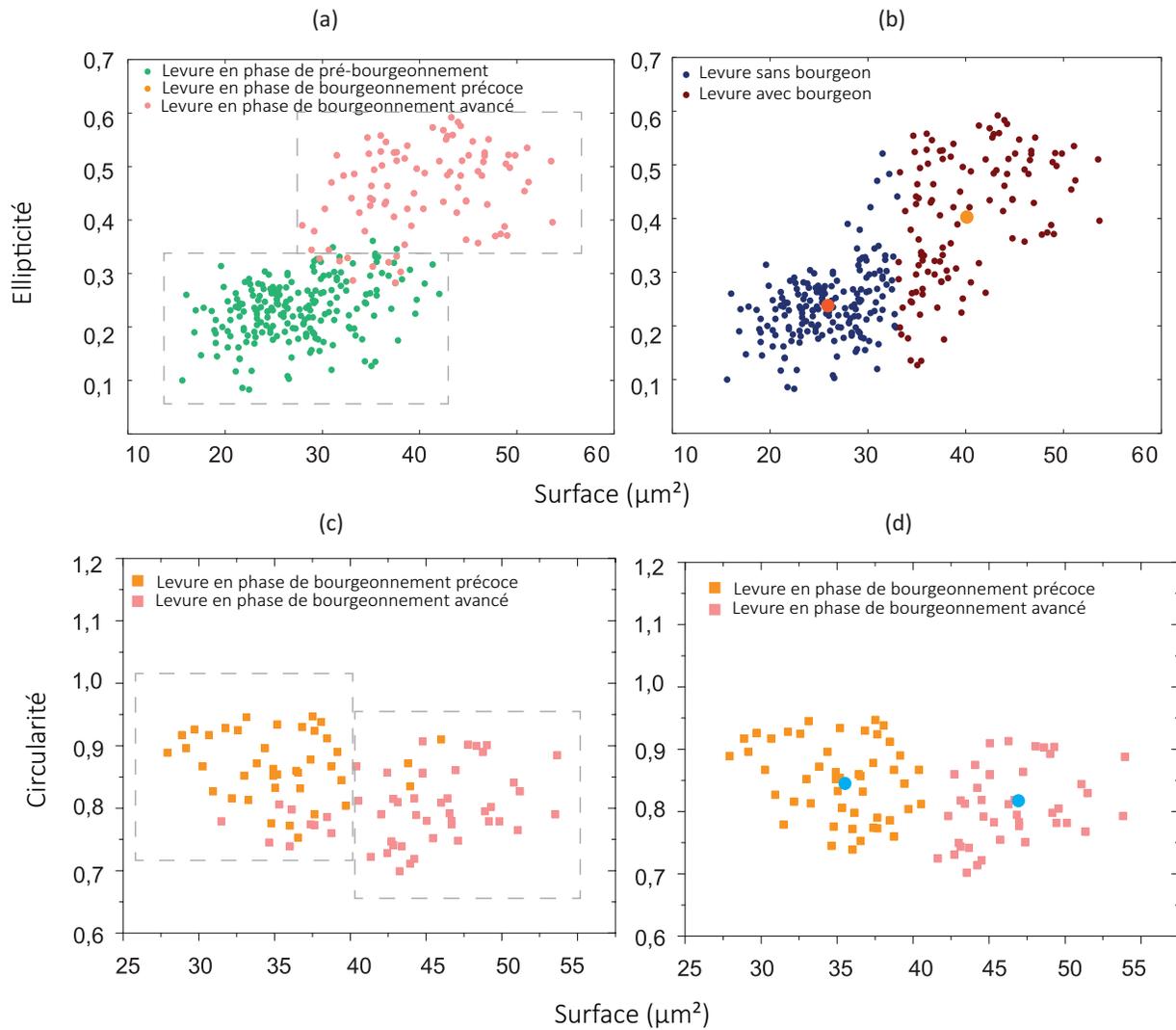


FIGURE 2.27 – Résultats de la classification non supervisée des populations. On compare les classifications utilisant (b) le critère d’ellipticité et (d) le critère de circularité des populations de levures présentées et identifiées par l’utilisateur (a) et (c). Les centroïdes des populations identifiées sont représentés par des cercles oranges et bleus sur les images et les populations à classer sont séparées schématiquement à l’aide de rectangles en pointillés gris.

les levures en bourgeoisement précoce et 91% pour les levures en bourgeoisement avancé.

La conclusion de cette étude est que la mesure de volume optique et de surface associés à des critères morphologiques permet de différencier des populations se trouvant dans des étapes différentes de leur cycle cellulaire et ce, sans supervision. L’idée est de pouvoir utiliser cette méthode de mesure en haut débit afin d’acquérir un grand nombre de données

Etat de la levure \ Zone	Phase S	Phase (G2 + M)
Avec petit bourgeon (phase S)	46 (94%)	3 (6%)
Avec gros bourgeon (phase G2 + M)	11 (27%)	30 (73%)

Tableau 2.17 – Synthèse des résultats de la classification non supervisée des populations de *S. cerevisiae* diploïde en croissance exponentielle en phase S et phase (G2+M).

afin de réaliser des statistiques sur des cellules dont la variabilité est plus grande. Cette méthode devrait également permettre de mettre en évidence des conditions expérimentales et ce, très rapidement sur des échantillons significatifs en terme de nombre d'individus.

## 2.5.4 Suivi temporel de la masse sèche de levures

### 2.5.4.1 Suivi temporel de levures *S. cerevisiae*

Intéressons nous maintenant au suivi dans le temps de la masse sèche de ces mêmes levures dans deux conditions de culture différentes. L'idée de cette étude est de voir si une différence en terme de taux de croissance est mesurable entre ces deux populations.

On ne réalisera pas une étude statistique, on comparera seulement les résultats obtenus sur quelques levures. Le protocole de l'expérience est le suivant : on prend des images d'OPD à intervalles de temps réguliers d'une même levure et de ses levures filles durant plusieurs heures. Un système autofocus nous garantissant une stabilité de focus à une cinquantaine de nm est utilisé. Une image est prise toutes les 15 secondes (voir Figure 2.28), les images sont ensuite segmentées et les données sont analysées. On représente la variation de leur volume optique en fonction du temps dans les graphiques de la Figure 2.29.

En ce qui concerne l'augmentation de volume, la trajectoire apparaît sigmoïde. Ceci a précédemment été décrit dans la littérature [80, 81, 82] et est dû à une croissance possédant des phases exponentielles et linéaires.

On peut d'ailleurs ajuster les points expérimentaux des différentes courbes par une courbe sigmoïde d'équation :  $y = \frac{V_{max}x^n}{k^n + x^n}$ . Les coefficients de détermination  $R^2$  se situent entre 0,98 et 0,99 pour les 3 courbes considérées (voir Figure 2.29(a)). Sur le même graphique, on représente également la somme des masses de toutes les levures dans le champ. La trajectoire est exponentielle et peut être ajustée grâce à un fit exponentiel du type  $A \exp(-x/t1) + y_0$  avec un coefficient  $R^2$  de 99,7% ( $A=6,14 \pm 0,16$ ,  $y_0 = 0,38 \pm 0,19$  et  $t_1 = -2,08 \pm 0,03$ ).

On calcule également des pentes de croissance décrivant la variation de masse en fonction du temps pour chacune des levures dans les 2 conditions de culture. On voit que la croissance des levures est plus lente lorsque les levures sont en état stationnaire, état caractérisé par une pente plus faible. En effet, les pentes sont de l'ordre de 8-10 pg/h contre une vingtaine de pg/h pour les levures en conditions de croissance exponentielle.

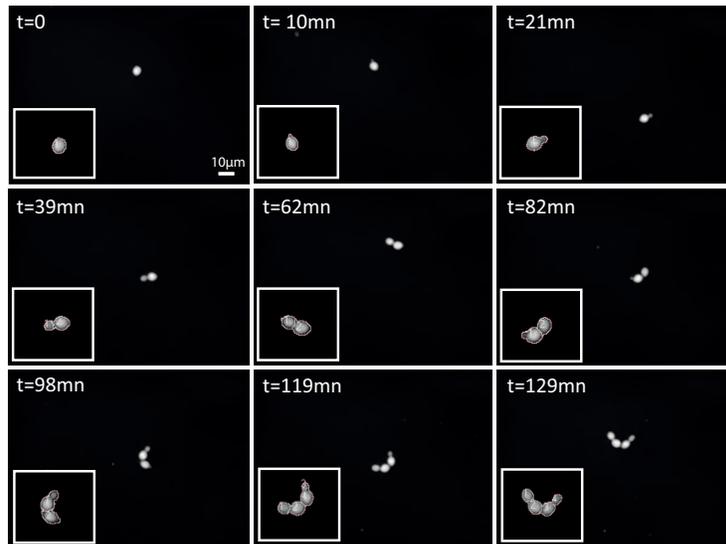


FIGURE 2.28 – Images d’OPD du suivi temporel de levures *S.cerevisiae* diploïdes en croissance exponentielle avec segmentation. Un agrandissement de la levure segmentée est réalisé et présenté dans le coin en bas à gauche afin de rendre en compte de la segmentation.

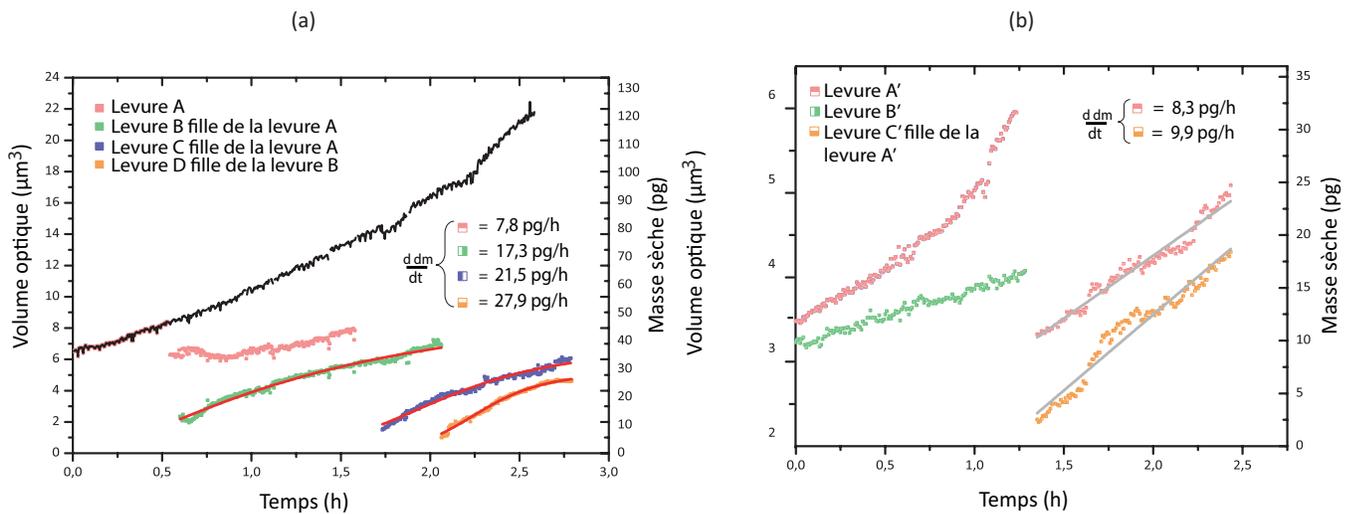


FIGURE 2.29 – Suivi temporel de levures *S.cerevisiae* diploïdes dans des conditions de croissance exponentielle (a) et dans un état stationnaire (b). Sur la figure (a), on suit la levure A (courbe rose) qui donnera 2 bourgeons : levure B (courbes verte) et levure C (courbe violette). La courbe noire représente la somme des masses des différentes levures dans le champ. La levure B donnera ensuite la levure D (courbe jaune). Sur la figure (b), on suit les levures A (courbe rose) et B (courbe verte), la levure A bourgeonne pour donner la levure C (courbe jaune).

Sur la figure 2.29, on voit que la division se fait de façon asymétrique comme cela a déjà été décrit [83] : la levure fille au moment de la division est toujours plus petite que la levure mère, ce que l'on peut constater sur les images ainsi qu'au niveau de la pente de croissance des levures filles qui est de plus en plus forte. Il existe un seuil de masse sèche ( $\approx 46$  pg ou de volume optique  $8,3 \mu\text{m}^3$ ) au delà duquel les levures entament un bourgeonnement.

En appliquant le test de Mann Whitney aux populations de levures diploïdes en état stationnaire et en croissance exponentielle, on met également en évidence grâce aux données précédentes des études de population une différence significative des valeurs de masse sèche des 3 types de population en pré-bourgeonnement, bourgeonnement précoce et bourgeonnement avancé.

#### 2.5.4.2 Suivi temporel de levures S.pombe

Les levures S.pombe se multiplient par élongation par les 2 extrémités. La surface croît linéairement pendant l'interphase avec une période de non-croissance juste avant la mitose [82].

On suit l'évolution de la masse sèche de 4 levures et le départ des levures filles (voir Figure 2.30).

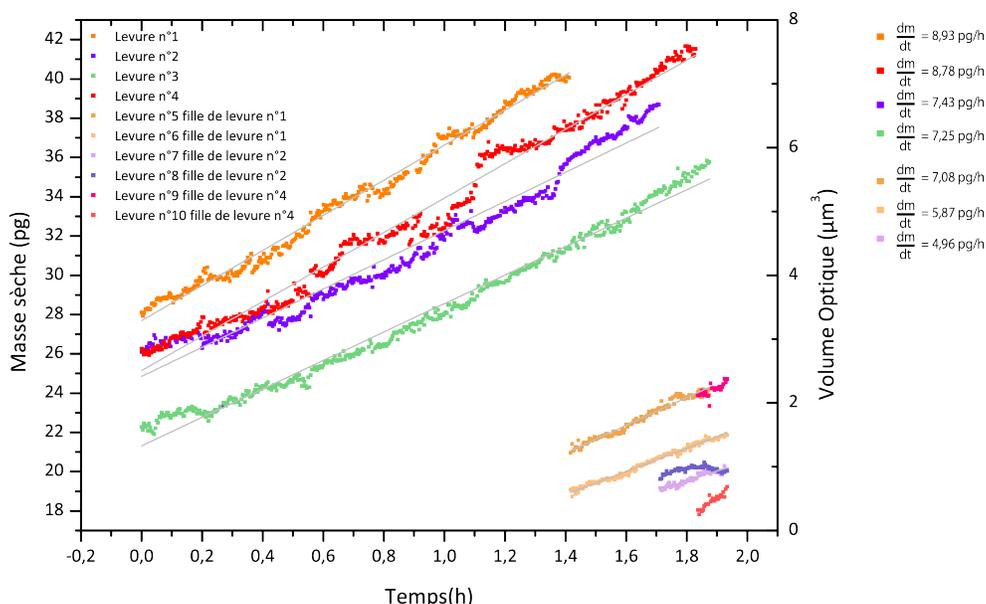


FIGURE 2.30 – Evolution de la masse sèche de levures S.pombe haploïdes en croissance exponentielle en fonction du temps. Observation et imagerie avec un objectif à air, grandissement total  $80\times$ ,  $ON=0,75$ ,  $\lambda=700 \pm 30$  nm.

L'évolution de la masse sèche en fonction du temps est linéaire comme le prédit la littérature et des régressions linéaires ont été effectuées sur les différentes courbes afin de

définir une pente de croissance des levures imagées (le coefficient de détermination  $R^2$  est de 0,98 en moyenne). L'évolution moyenne est de 8,1 pg/h soit environ 0,13 pg/min. Cette valeur est tout à fait comparable à celle que l'on peut trouver dans la littérature [47] de 0,18 pg/min évaluée sur une seule levure.

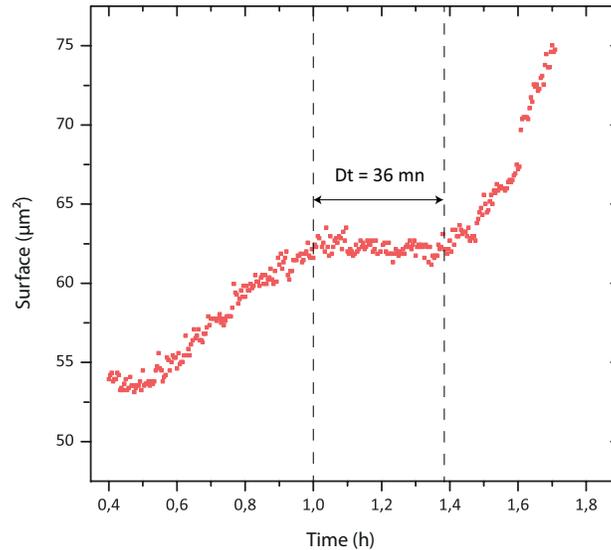


FIGURE 2.31 – Evolution de la surface d’une levure *S.pombe* haploïde en croissance exponentielle en fonction du temps. Observation et imagerie avec un objectif à air, grandissement total 80×, ON=0,75,  $\lambda=700 \pm 30$  nm.

Les légères fluctuations de masse sèche observées sont dues essentiellement aux levures n°1 & 3. Par contre, les fluctuations de plus grande amplitude qui peuvent être également observées, au niveau de la levure n°2 par exemple, sont dues au fait que cette levure diffusait plus que les autres dans le milieu et passait parfois hors focus, ce qui gênait la segmentation et entraînait une erreur dans la mesure de masse sèche.

Pour une de ces levures, l'évolution de la surface en fonction du temps est représentée Figure 2.31. On voit clairement un plateau de 36 minutes avant la mitose. Ici encore, cette valeur est proche de celle trouvée dans la littérature de 35 mn [47].

### 2.5.4.3 Conclusions

En conclusion à cette partie sur la mesure de taux de croissance, on peut dire que l'on est en mesure de déterminer des différences d'évolution entre populations placées dans des milieux de culture différents grâce à des mesures de masse sèche effectuées à différents temps. Les taux de croissance sont déterminés avec des erreurs de l'ordre du centième de pg/h, une comparaison à des valeurs trouvées dans la littérature a été effectuée afin de vérifier la validité de la mesure. On peut également voir des changements d'évolution comme

dans le cas des levures *S. pombe* qui possèdent différentes étapes où la masse sèche évolue différemment.

L'intérêt d'effectuer une telle mesure réside dans le fait qu'une mesure de taux de croissance ou un ralentissement de croissance d'une population de façon précise peut permettre d'évaluer l'effet d'un changement de condition expérimentale ou d'un produit ajouté dans un milieu de culture. On voit tout de suite son intérêt pour des expériences pharmacologiques où on recherche à démontrer l'effet d'un produit.

De plus, la similitude de forme entre les levures et les bactéries permet d'envisager la transposition de ces expériences à des études bactériologiques, le principe étant classiquement de voir l'effet d'un antibiotique sur leur prolifération et ce, le plus rapidement possible.

Une contrainte pour cette mesure est de pouvoir la réaliser rapidement. Pour déterminer le temps minimum nous permettant de déterminer un taux de croissance en faisant le minimum d'erreur possible, on doit déterminer le lien entre l'échantillonnage de la mesure (*i.e.* le nombre de mesure de masse par minute ou par heure) et la précision souhaitée. On peut appliquer cette technique d'étude au suivi de l'effet de drogues ou de mutations sur la croissance.

### **2.5.5 Optimisation de l'échantillonnage temporel dans le cadre de l'évolution de masse sèche d'une population**

Nous venons de voir qu'il est possible, grâce aux images d'OPD et à leur segmentation automatique, de mesurer l'évolution de la masse sèche de cellules au cours du temps. On devrait avoir par ce moyen une idée de leur état (*i.e.* en croissance ou non). En effet, si une cellule n'est pas dans un état permettant une croissance, alors l'évolution de sa masse sèche avec le temps va être faible. Il en sera de même si elle est neutralisée par une drogue affectant son évolution. Dans la plupart des cas, on a vu que l'évolution de la masse sèche est linéaire au cours du temps pour les cellules. On peut donc effectuer une régression linéaire afin de connaître le taux de croissance d'une cellule ou d'une population.

L'idée générale de ce qui suit est de déterminer en un minimum de temps si la population est en croissance ou non. On pourra de cette façon déterminer l'effet sur la croissance d'un produit ou d'une condition expérimentale sur la croissance cellulaire.

Si on suppose que les fluctuations de masse correspondent à une variable aléatoire de loi normale, on peut relier simplement la précision sur le taux de croissance à l'écart-type de ces fluctuations.

#### **2.5.5.1 Relation entre précision de la mesure et échantillonnage temporel : modèle statistique**

On suppose que la masse sèche suit une loi de type :  $m(t)=a(t) + b$  où  $a$  est le taux de croissance. Dans la réalité, il s'agit d'une variable aléatoire :  $m_i=a \cdot t_i + b + e_i$  où  $e_i$  est

une variable aléatoire normale d'écart-type  $s$ ,  $t_i$  correspond aux temps de mesure (variable indépendante). Pour simplifier les calculs, on va supposer que la masse est mesurée à intervalles réguliers  $Dt$  pendant un temps  $T$ , ce qui représente  $N$  points de mesure.

Des estimateurs de  $a$  et  $b$  sont obtenus par régression linéaire.  $a$  est alors une variable aléatoire normale dont l'écart-type vaut :

$$\sigma(a)^2 = \frac{\sigma^2}{\sum (t_i - t)^2} \quad (2.12)$$

Il s'agit de calculer la valeur de la série statistique du dénominateur, avec l'hypothèse des temps équirépartis :  $t_i = i Dt$ . On peut en trouver une valeur exacte en utilisant les deux identités :

$$\sum_{i=1}^n (i) = \frac{N(N+1)}{2} \quad (2.13)$$

$$\sum_{i=1}^n (i^2) = \frac{N(N+1)(2N+1)}{6} \quad (2.14)$$

Dans la limite des  $N$  grands, on trouve que :  $\sum (t_i - t)^2 \rightarrow Dt^2 \frac{N^3}{3} = \frac{NT^2}{3}$ .

On obtient donc une relation entre les fluctuations de la mesure et la précision du taux de croissance :

$$\sigma(a) = \frac{\sqrt{3}\sigma}{T\sqrt{N}} \quad (2.15)$$

$$= \frac{\sqrt{3}\sigma\sqrt{Dt}}{T^{3/2}}. \quad (2.16)$$

On peut réécrire cette équation de manière adimensionnée en utilisant des variables réduites. Si on suppose que la masse double le temps d'un cycle de manière linéaire, le taux de croissance vaut donc  $a = dm/T_c$  où  $dm$  est la variation de masse sur un cycle et  $T_c$  est la durée d'un cycle. On peut exprimer les fluctuations de masse relativement à  $dm$  :  $\sigma = \sigma_m \delta m$  ainsi que la durée totale de la mesure relativement à la durée du cycle :  $T = \tau T_c$  et  $Dt = \delta \tau T_c$ . On obtient l'équation :

$$\frac{1}{RSB} \equiv \frac{\sigma(A)}{A} = \sqrt{3} \frac{\sigma_m \delta \tau^{1/2}}{\tau^{3/2}}. \quad (2.17)$$

On peut appliquer ces formules sur divers exemples. Si l'on veut déterminer si une cellule est dans un type de croissance, il faut que le rapport signal sur bruit (RSB) soit supérieur à 3 (test de l'hypothèse de non nullité du taux de croissance vrai à 99%, ou 3 sigma). Dans ce cas, si on suppose que les fluctuations de la masse sont de l'ordre de 10%, on peut réécrire l'équation précédente pour trouver l'intervalle de temps entre deux mesures en fonction du temps total de mesure :

$$\delta \tau = \tau^3 \left( \frac{1}{\sqrt{3} RSB \sigma_m} \right)^2. \quad (2.18)$$

### 2.5.5.2 Analyse des données

Par exemple, dans le cas d'une population de levures telle que la durée du cycle est de 2h environ et que l'on veut réaliser la mesure sur 1h, en considérant que le  $RSB=3$  et  $\sigma_m=0,3$  pg, il faudrait prendre une image toutes les 6 minutes pendant 1h pour être capable de déterminer un taux de croissance. On reprend quelques résultats issus du suivi de levures *S. cerevisiae* et on échantillonne la courbe avec 1 point toutes les 6 minutes pendant 1h, ceci correspond à l'échantillonnage minimal qui permet de mesurer une pente tout en minimisant l'erreur sur la détermination de cette dernière. On compare ces résultats à ceux obtenus avec l'échantillonnage précédent, c'est-à-dire avec une mesure toutes les 30 secondes environ. Les résultats sont présentés dans le Tableau 2.18.

Échantillonnage	Croissance/État	Pente de croissance (pg/h)	Erreur (pg/h)
Correct	Exponentielle	27,9	
Minimal	Exponentielle	29,2	1,3 (4,6 %)
Correct	Exponentielle	21,6	
Minimal	Exponentielle	22,9	1,4 (5,9 %)
Correct	Stationnaire	10,1	
Minimal	Stationnaire	9,3	0,8 (8 %)
Correct	Stationnaire	3,7	
Minimal	Stationnaire	3,7	0 (0,3 %)

Tableau 2.18 – Synthèse des résultats de comparaison des pentes de croissance de levures *S.cerevisiae* diploïdes en croissance exponentielle et phase stationnaire entre les courbes échantillonnées correctement et sous échantillonnées.

A partir de ces résultats, on peut en conclure que cette méthode de mesure nous permet de remonter à une valeur de taux de croissance suffisamment précise pour différencier croissance exponentielle et état stationnaire tout en réalisant un minimum de mesures.

### 2.5.6 Étude quantitative de l'influence du marquage fluorescent sur la quantité de masse sèche de cellules

La fluorescence est couramment utilisée en biologie pour étudier spécifiquement une molécule ou une protéine au sein de cellules.

Suivant la nature du marquage et la façon dont il est réalisé, on peut faire l'hypothèse que son effet sur les cellules n'est pas neutre. La photo-toxicité engendrée par ce marquage ou les étapes même de ce dernier bouleversent la cellule et sa quantité de matière.

L'étude suivante a pour objet l'évaluation de l'influence du marquage sur la valeur de masse sèche de cellules. On étudiera deux types de marquage : un marquage réalisé par transfection qui conduit à l'expression d'une protéine abondante dans la cellule et

un marquage de l'ADN à l'aide d'une petite molécule qui va s'intercaler entre certaines bases de l'ADN. L'idée est de voir l'influence du choix du marqueur sur la masse sèche des cellules.

### 2.5.6.1 Marquage de l'actine par transfection, étude d'une lignée stable de cellules de type HT1080

La transfection permet l'introduction dans des cellules eucaryotes d'ADN exogène codant pour une protéine cible dans une cellule. Différentes techniques chimiques ou physiques permettent ce transfert de gènes qui s'effectue à l'aide de plasmide (ADN circulaire) contenant les gènes d'intérêts et les éventuels promoteurs qui permettent à la machinerie cellulaire d'effectuer la transcription du gène en ARN, puis sa traduction en une protéine de fusion. Cette dernière rassemble la protéine cible d'intérêt, un linker et une protéine fluorescente.

On utilise une lignée de fibrosarcomes (type de tumeur), appelées HT1080. La lignée a été initiée à partir d'une biopsie d'un fibrosarcome effectué sur un humain mâle n'ayant pas subi de radiothérapie ni de chimiothérapie.

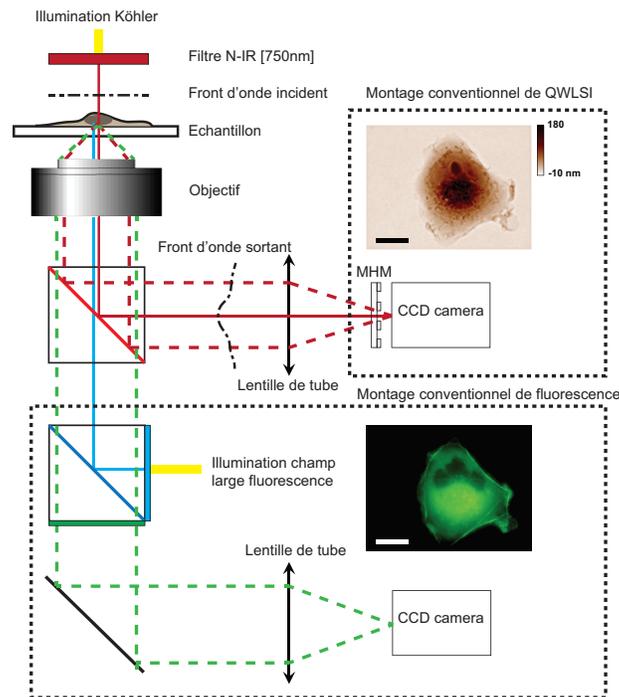


FIGURE 2.32 – Schéma du montage Phase/fluorescence en simultané. Le microscope utilisé est composé de deux étages. L'imagerie de phase est réalisée avec la lumière filtrée proche infra rouge à l'aide du filtre passe bande  $700 \pm 30$  nm.

Dans cette expérience, on désire comparer la masse sèche de cellules issues d'une lignée

stable de HT1080 fluorescentes (dites HT1080 Lifeact [84]) dont une protéine, l'actine, a été marquée grâce à une GFP (pour Green Fluorescent Protein) à celle de cellules contrôles non marquées (HT1080 wt pour wild type). Le but de cette expérience est de déterminer si ce marquage fluorescent influence la masse sèche des cellules et si l'on est en mesure de le détecter.

L'actine est la protéine la plus abondante dans les cellules, elle est présente dans toutes les cellules du corps et particulièrement dans les cellules musculaires. Elle est notamment impliquée entre autre dans la motilité, la division cellulaire, les mouvements vésiculaires et la contraction musculaire. Elle peut représenter jusqu'à 15% de la masse totale protéique des cellules.

Pour faire exprimer une protéine fluorescente à la cellule, on lui fait exprimer une protéine de fusion composée de la protéine actine à laquelle est fusionnée une GFP qui agit comme un phare permettant de repérer l'actine présente dans la cellule.

On réalise d'abord une étude de population sur un échantillon de HT1080 wt, en suivant le même protocole que précédemment. Ensuite, on réalise une étude de population sur un échantillon de HT1080 Lifeact en contrôlant l'intensité de fluorescence pour éviter les cellules "trop" fluorescentes par rapport aux autres. On acquiert à chaque fois une image de phase et une image de fluorescence. Ceci permet de repérer les cellules fluorescentes puisque l'on a constaté qu'après plusieurs divisions certaines cellules ne sont plus fluorescentes. La multimodalité phase/fluorescence en simultané est rendue possible grâce à un microscope possédant 2 étages (voir Figure 2.32). Les résultats obtenus sont représentés dans le graphe de la Figure 2.33(a).

On peut remarquer un décalage entre la distribution de HT1080 contrôles et de HT1080 Lifeact au niveau de la figure 2.33(a). Ce décalage nous est confirmé par les données quantitatives (voir tableau 2.20) et est clairement visible sur l'histogramme de la figure 2.33(b). En comparant les valeurs de médiane et d'écart-type des deux populations, on peut conclure sur le fait que le marquage fluorescent apporte un biais à la mesure de masse sèche, biais évalué à 57 pg soit près de 20 % de la masse sèche totale de la cellule en considérant la différence entre les deux médianes.

En obligeant la cellule à surexprimer une protéine, on modifie drastiquement son métabolisme. On peut supposer que le biais mesuré provient des nombreuses protéines produites mais peut-être également de la machinerie cellulaire que la cellule développe pour la production en grande quantité de la protéine. Le test statistique de Mann Whitney appliqué à ces résultats confirme le caractère très significatif de cette différence ( $p = 10^{-5}$ ).

**2.5.6.1.1 Synthèse des résultats** On cherche à évaluer l'incrément de masse apporté par le seul marquage grâce à une étude d'ordres de grandeur des masses des différents constituants de la molécule fluorescente et de la quantité d'actine présente dans les cellules. La protéine fluorescente est une TAG GFP qui se lie à l'ADN grâce à un peptide de 17

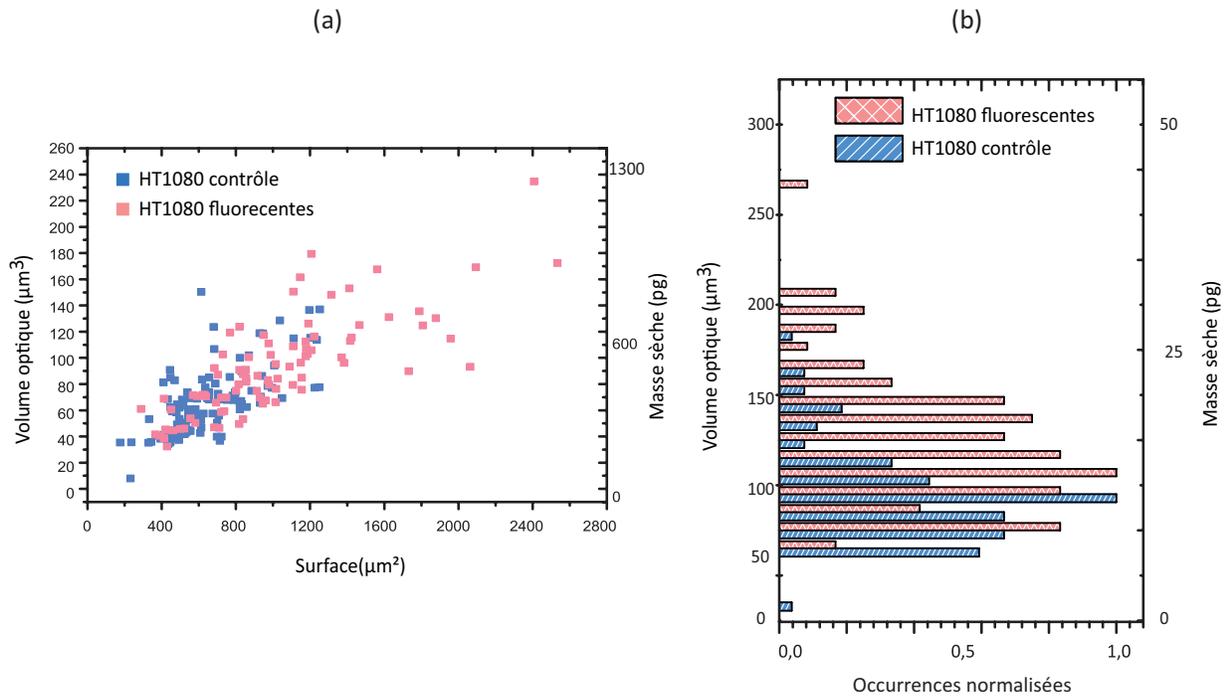


FIGURE 2.33 – (a) Différence de volume optique/matière sèche en fonction de la surface de chaque cellule imagée d’une population de 83 cellules HT1080 Lifeact fluorescentes (*en carrés bleus*) et d’une population composée de 274 cellules HT1080 wild type (*en carrés roses*) en conditions de culture exponentielles. (b) Histogramme des populations observées en (a). Observation avec un objectif 40× et un grandissement supplémentaire 2×, ON=0,75 et source blanche filtrée  $\lambda=700\pm 35$  nm.

83 cellules	HT1080 contrôles		
	Surface (μm <sup>2</sup> )	Volume optique (μm <sup>3</sup> )	Masse sèche (pg)
<b>Moyenne</b>	606,0	58,6	325,3
<b>Médiane</b>	556,4	51,4	285,4
<b>Ecart type</b>	257,8	24,1	133,6
274 cellules	HT1080 marquées		
	Surface (μm <sup>2</sup> )	Volume optique (μm <sup>3</sup> )	Masse sèche (pg)
<b>Moyenne</b>	1064,7	76,1	422,6
<b>Médiane</b>	976,0	61,6	342,3
<b>Ecart type</b>	635,9	35,3	195,9

Tableau 2.19 – Synthèse des résultats de la mesure de masse sèche des 2 populations de cellules de type HT1080 de contrôle et fluorescentes.

acides aminés. On évalue la masse de l’ensemble {peptide + GFP} :

Il y a peu de données sur la masse d’actine présente dans les cellules. Néanmoins,

Élément	Masse (Dalton et gramme)
Peptide de liaison	2212,5 Da soit $3,67 \times 10^{-21}$ g
TagGFP	37000Da soit $6,14 \times 10^{-20}$ g
Lifect	$6,5 \times 10^{-20}$ g

Tableau 2.20 – Synthèse des données relatives aux masses des constituants de la protéine TAG GFP.

pour des cellules non musculaires, comme des cellules hépatiques, il a été évalué  $5 \cdot 10^8$  monomères d'actine. Dans le cas où tous ces monomères seraient marqués avec la protéine fluorescente, on trouverait un incrément de masse sèche de 32 pg. Expérimentalement, on trouve un incrément de 57 pg. Le résultat est du bon ordre de grandeur mais plus élevé que ce à quoi on pourrait s'attendre au maximum. Ceci pourrait s'expliquer par le fait que le type cellulaire est différent, que certaines protéines fluorescentes sont présentes au sein de la cellule sans être spécifiquement liées à l'actine (marquage non-spécifique) et par la surexpression de l'actine.

### 2.5.6.2 Marquage de l'ADN de cellules COS-7 avec la sonde sonde Hoechst 33342

On vient de voir qu'un marquage de l'actine influence la masse sèche des cellules. Il serait intéressant de voir si c'est le cas pour un autre marquage d'une substance moins abondante dans la cellule, comme l'ADN par exemple.

On s'intéresse maintenant à un marquage différent réalisé sur des cellules de type COS-7, cellules immortalisées de type fibroblastique issues de rein de singe vert africain. Cette fois, le marquage est exogène : la cellule n'exprime pas une protéine fluorescente mais une molécule, ici Hoechst 33342. Celle-ci va se lier préférentiellement aux régions riches en bases AT (Adénine et Thymine) de l'ADN, bien qu'elle puisse également se fixer sur d'autres régions riches en bases GC (Guanines et Cytosines).

Pour cela, on réalise une première étude de population sur un échantillon de COS-7 non fluorescentes afin d'avoir une population "contrôle". Ensuite, on réalise une étude de population sur un échantillon de COS-7 dont l'ADN est marqué (3 lavages au PBS, marquage avec Hoechst 33342 à  $1 \mu\text{g/ml}$  pendant 5 min, puis 3 lavages au PBS avant imagerie dans le milieu de culture). Les résultats obtenus sont représentés dans le graphe de la Figure 2.34(a).

On peut remarquer un décalage très léger entre la distribution de COS-7 contrôles et de COS-7 marquées (Figure 2.34(a)). Au niveau de l'histogramme de la Figure 2.34(b), les deux populations semblent se superposer avec une variabilité accrue du côté des cellules marquées et on peut mesurer une différence de masse sèche de 8 pg.

Ce résultat ne paraît pas significatif comparé à la variabilité cellulaire. Le caractère non significatif du résultat est également confirmé par le test statistique ( $p = 0,36$ ).

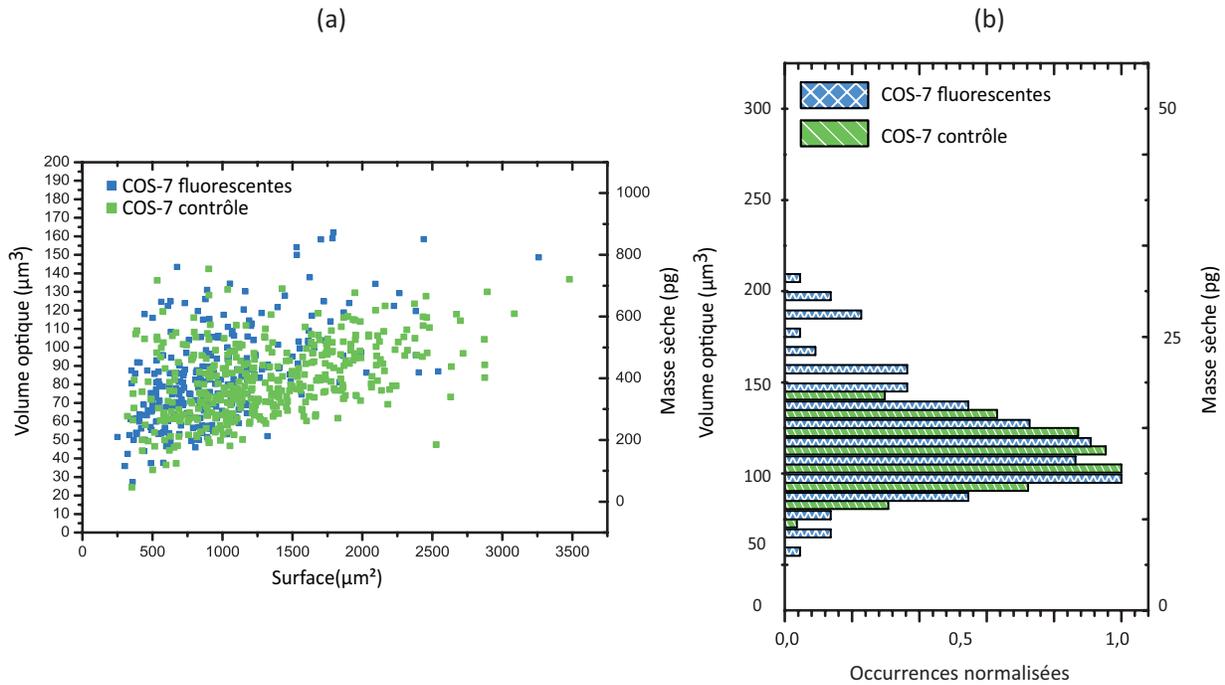


FIGURE 2.34 – (a) Observation de la différence de volume optique/matière sèche en fonction de la surface de chaque cellule d’une population de cellules COS-7 contrôle (*en carrés verts*) et COS-7 marquées (*en carrés bleus*) en conditions de culture exponentielles. (b) Histogramme de la distribution de masse sèche des deux populations observées en (a). Observation avec un objectif à air avec un grandissement total de  $80\times$ ,  $ON=0,75$ . La source blanche est filtrée  $\lambda=700 \pm 35$  nm.

940 cellules	COS-7 contrôles		
	Surface ( $\mu\text{m}^2$ )	Volume optique ( $\mu\text{m}^3$ )	Masse sèche (pg)
<b>Moyenne</b>	1577,40	83,72	465,4
<b>Médiane</b>	1547,5	83,22	462,31
<b>Ecart type</b>	523,05	16,83	93,48
281 cellules	COS-7 marquées		
	Surface ( $\mu\text{m}^2$ )	Volume optique ( $\mu\text{m}^3$ )	Masse sèche (pg)
<b>Moyenne</b>	986,52	91,57	508,73
<b>Médiane</b>	867,40	81,73	454,08
<b>Ecart type</b>	514,43	47,16	262,02

Tableau 2.21 – Synthèse des résultats de la mesure de masse sèche des 2 populations de cellules COS-7 contrôles et marquées

De même qu’on l’a fait précédemment, essayons de déterminer l’incrément de masse attendu grâce au marquage de l’ADN avec la molécule utilisée.

On connaît la masse de la molécule :  $m(\text{Hoechst 33342}) = 10^{-9}$  pg. Dans une cellule de mammifère supérieur comme l'homme ou le singe vert, on considère qu'il existe  $3,2 \cdot 10^9$  paires de bases d'ADN.

Dans le cas où on marquerait tout l'ADN, on trouverait un incrément de masse  $\Delta m = 3$  pg avec des cellules haploïdes et 6 pg avec des diploïdes. Expérimentalement, on trouve  $\Delta m = 8$  pg sur la médiane. L'augmentation de masse est encore une fois plus forte que celle attendue mais du bon ordre de grandeur.

L'influence de ce marquage est négligeable en ce qui concerne la masse sèche des cellules par contre, la variabilité accrue des cellules (de près de 2,8 fois plus importante) marquées peut être le témoin d'un dysfonctionnement de la cellule avec une surexpression de certaines protéines.

**2.5.6.2.1 Conclusion de l'étude de l'influence d'un marquage fluorescent sur la masse sèche de cellules** En conclusion à cette étude, on peut constater l'influence du marquage cellulaire sur la valeur de masse sèche dans le cas où il est effectué sur une protéine abondante dans la cellule. Le biais est évalué à près d'une soixantaine de pg sur des cellules contenant entre 200 et 500 pg de masse sèche.

Il faut donc rester prudent quant à l'utilisation de la fluorescence pour réaliser des mesures de masse sèche en biologie et avoir à l'esprit que les cellules transfectées peuvent être amenées à synthétiser une quantité supplémentaire de protéines non négligeable, et donc à subir des modifications métaboliques voire structurales importantes.

## 2.6 Conclusion sur le modèle projectif

La mesure d'OPD interprétée dans le cadre du modèle projectif permet de quantifier des différences de chemin optique d'échantillons semi-transparents avec une résolution de 0,38 nm.

La mesure d'OPD appliquée à un échantillon caractérisé par mesure AFM de silice gravée est donnée avec une précision de l'ordre du nanomètre et une mesure d'indice a été réalisée sur une fibre optique avec une précision de l'ordre de  $10^{-3}$  pour le cœur et de  $10^{-5}$  pour la gaine de la fibre.

En intégrant l'OPD sur la surface d'une cellule, on a montré qu'on pouvait quantifier sa masse sèche. En étudiant l'évolution de cette grandeur dans le temps en allant jusqu'à plusieurs dizaines d'heures avec une seule référence en début d'expérience, on peut mesurer des taux de croissance et comparer cette valeur pour des populations placées dans des milieux induisant une croissance différente.

En étudiant la valeur de masse sèche d'une population entière à un instant  $t$  et la valeur de la surface de la cellule, on peut réaliser une classification des cellules en fonction de leur étape au sein du cycle cellulaire. L'ellipticité du noyau, sa convexité et son absence,

ainsi que la condensation de l'ADN en chromosomes sont des paramètres morphologiques auxquels on a accès grâce à nos images et qui sont utilisés pour déterminer dans quelle phase du cycle se trouvent les cellules.

La méthode est simple d'implémentation. Sa résolution et l'absence d'artéfacts sur les images font de l'IDQL une technique performante et précise pour réaliser des mesures de masse sèche dont les résultats sont comparables à ceux trouvés dans la littérature. Une étude a été menée sur différentes populations de levures. Des différences en terme de masse sèche ont été mesurées entre des populations en croissance exponentielle et en phase stationnaire correspondant à des valeurs mesurées par des techniques spectroscopiques qui ont l'avantage de permettre des mesures précises et de différencier les différents constituants entre eux mais ces techniques sont plus difficiles à mettre en place et invasives. L'expérience de suivi de masse sèche dans le temps d'une levure *S. pombe* a permis de déterminer un taux de croissance comparable à celui trouvé dans la littérature (0,13 pg/min par ID4L et 0,18 pg/min par DHM [47]).

Grâce à une mesure comparative de masse sèche entre populations cellulaires marquées et non marquées, on a pu mettre en évidence le biais en terme de matière sèche qui peut être introduit par le marquage d'une protéine qui se trouve abondante au sein de la cellule.

Un autre résultat important obtenu est la possible classification non supervisée de sous-populations cellulaires très proches à la fois d'un point de vue morphologique et en terme de masse sèche.

La mesure d'OPD telle que présentée dans le cadre de l'approximation projective ne permet qu'une mesure globale sur tout l'échantillon. Il est difficile grâce à cette mesure de ne contraster qu'un seul type de composant ou d'identifier spécifiquement un constituant au sein de l'échantillon. L'indice de réfraction pourrait permettre une caractérisation de l'élément mais le couplage avec l'épaisseur physique rend cette caractérisation impossible. L'idée du troisième chapitre de cette thèse est de modifier l'illumination utilisée dans le but d'ajouter un caractère spécifique au contraste apporté.



---

### L'anisotropie comme nouvelle source de contraste quantitatif

---

Ce chapitre est consacré à l'imagerie et la mesure de retard optique appliqués à des échantillons biologiques anisotropes. La faisabilité, la caractérisation de la méthode et des résultats seront présentés afin de définir les atouts et les possibles applications d'une telle technique en biologie.

#### 3.1 Contexte

La principale idée justifiant le fait de polariser l'illumination réside dans le fait qu'un contraste supplémentaire spécifique de certains constituants dits anisotropes au sein de l'échantillon peut être créé afin d'obtenir une nouvelle information quantitative (voir Figure 3.1). L'augmentation de contraste est spécifique, on ne voit plus l'échantillon dans sa globalité mais seulement certaines structures qui peuvent être d'intérêt dans le cadre d'études qui seront détaillées par la suite.

Le but ici est d'utiliser une propriété intrinsèque de certains matériaux au sein desquels la lumière, en fonction de sa polarisation et de sa direction de propagation, va se propager avec des vitesses différentes. La vitesse de groupe de l'onde étant inversement proportionnelle à l'indice de réfraction, le déphasage mesuré par notre technique sera différent en fonction de la polarisation d'illumination.

#### 3.2 Introduction

##### 3.2.1 Notions de polarimétrie

On peut représenter le champ électromagnétique par un vecteur de  $\mathbb{C}^2$ . Lors de la propagation à travers un milieu isotrope, dont les propriétés sont identiques quelle que soit la

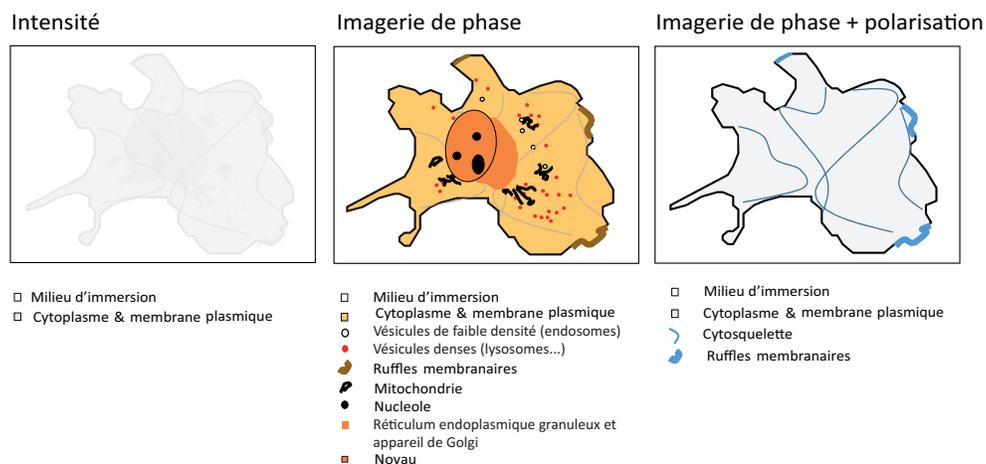


FIGURE 3.1 – Vision schématique présentant le potentiel intérêt d'utiliser une mesure de polarisation en plus d'une mesure de phase.

direction de l'espace, on peut décrire le champ par un scalaire. Par contre, dans le cas de milieux anisotropes, les deux composantes du vecteur champ électromagnétique évoluent différemment lors de la propagation [85].

On peut, en décomposant le champ électrique en ses deux composantes orthogonales, étudier l'évolution temporelle d'une composante par rapport à l'autre et définir des états de polarisation différents. Lorsque les deux composantes oscillent en phase, le rapport entre les deux composantes du champ est un nombre réel : la polarisation est dite rectiligne. Si elles présentent un déphasage (*i.e.* une des composantes est en retard par rapport à l'autre), alors la polarisation est dite elliptique. Dans le cas particulier où le déphasage entre les deux composantes vaut  $\pm\pi/2$  et que les deux composantes ont la même amplitude, la polarisation est circulaire.

L'étude des propriétés polarimétriques d'un milieu est appelée polarimétrie. Elle permet de déduire des propriétés polarimétriques d'un milieu en mesurant l'état de polarisation de la lumière après sa propagation à travers ce milieu.

Après interaction de la lumière avec un milieu, les composantes du champ électrique peuvent être modifiées en termes d'atténuation d'amplitude, de déphasage entre les deux composantes du champ et de dépolarisation (perte de mémoire de la polarisation incidente). L'étude de ces modifications permet ainsi d'obtenir directement des informations sur le milieu traversé que je détaillerai dans divers exemples.

On s'intéresse à l'étude des milieux anisotropes. Un milieu anisotrope est un milieu dont les propriétés diffèrent en fonction de la direction dans l'espace. Pour ce type de milieu, l'indice de réfraction dépend de la direction de propagation et se manifeste expérimentalement par une biréfringence. De manière générale, un milieu anisotrope est un milieu dont

les propriétés optiques, et en particulier l'indice de réfraction, vues par un champ électromagnétique s'y propageant, dépendent de la direction de propagation de celle-ci ainsi que de sa polarisation.

On rappelle dans un premier temps les équations de Maxwell dans un milieu isotrope sans source. Les champs électrique dans le matériau dans le cas d'une onde plane de vecteur propre  $\vec{k}$  et de pulsation  $\omega$ , le vecteur champ électrique s'écrit :

$$\vec{E} = \vec{E}_0 \exp i(\vec{k}\vec{r} - \omega t). \quad (3.1)$$

Les équations de Maxwell dans le milieu s'écrivent alors :

$$\vec{rot}E = -\frac{\partial B}{\partial t} \quad \vec{div}D = 0 \quad (3.2)$$

$$\vec{rot}H = \frac{\partial D}{\partial t} \quad \vec{div}B = 0 \quad (3.3)$$

Quand l'onde  $\mathcal{EM}$  traverse un milieu matériel, elle induit une polarisation.

$$\vec{P} = \epsilon_0[\chi] \times \vec{E} \quad (3.4)$$

avec  $\epsilon_0$  la permittivité diélectrique du vide et  $[\chi]$  le tenseur de susceptibilité électrique linéaire. On peut réécrire les équations de Maxwell dans ce cas dans l'espace de Fourier :

$$\vec{k} \cdot \vec{D} = 0 \quad \vec{k} \cdot \vec{B} = 0 \quad (3.5)$$

$$\vec{k} \times \vec{H} = -\omega \vec{D} \quad \vec{k} \times \vec{E} = \omega \vec{B}. \quad (3.6)$$

avec  $\vec{D} = \epsilon_0[\epsilon]\vec{E}$  On en déduit que  $\vec{k}$  est orthogonal au plan  $(\vec{B}, \vec{D})$  qui est appelé *plan d'onde* et  $\vec{E}$  appartient au plan  $(\vec{k}, \vec{D})$ . Dans le cas des milieux anisotropes la direction des rayons lumineux n'est pas confondue avec  $\vec{k}$ , les vecteurs  $\vec{D}$  et  $\vec{H}$  d'une part et  $\vec{E}$  et  $\vec{B}$  d'autre part sont orthogonaux.

La matrice 3 x 3 représente le tenseur de permittivité diélectrique  $[\epsilon_r]$  et s'écrit dans la base de ses vecteurs propres :

$$[\epsilon_r] = \begin{pmatrix} n_1^2 & 0 & 0 \\ 0 & n_2^2 & 0 \\ 0 & 0 & n_3^2 \end{pmatrix} \quad (3.7)$$

où les  $n_i$  sont les indices propres du milieu.

Selon la nature du milieu, 3 cas de figure peuvent se produire :

—  $n_1 \neq n_2 \neq n_3$ . Dans ce cas, le milieu est dit *biaxe*.

—  $n_2 = n_3 \neq n_1$ . Dans ce cas, le milieu est dit *uniaxe* et le champ  $\vec{E}_1$  définit une direction perpendiculaire au plan créé par le système défini par  $(\vec{E}_2, \vec{E}_3)$ .

—  $n_1 = n_2 = n_3$ , toutes les directions sont équivalentes et le milieu est dit *isotrope*.

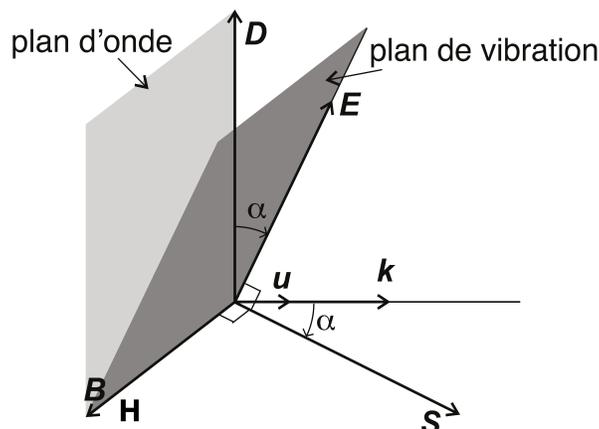


FIGURE 3.2 – Représentation schématique des différents vecteurs issus de la propagation d'une onde plane dans un milieu anisotrope.

Dans le cas de milieux anisotropes, il existe des directions de l'espace selon lesquelles une onde peut se propager dans le milieu avec une seule vitesse de phase (*i.e.* un seul indice), ces directions sont appelées axes optiques du milieu et correspondent aux vecteurs propres de  $[\epsilon_r]$ .

Les milieux anisotropes peuvent être de deux types. Ils peuvent être linéaires ou circulaires. Les milieux d'anisotropie linéaire ont les états propres de propagation qui sont des états de polarisation rectiligne. Ils sont caractérisés par le fait que la propagation d'une lumière polarisée de façon rectiligne après une épaisseur de milieu  $e$  aura ses composantes déphasées tandis que cette même traversée d'un milieu circulaire aura pour effet de tourner la polarisation proportionnellement à l'épaisseur de milieu traversé.

Les milieux présentant du dichroïsme circulaire ou linéaire quant à eux n'absorbent pas de manière identique les composantes du champ électromagnétique.

Dans la suite de cette étude, on s'intéressera plus particulièrement aux milieux anisotropes linéaires et uniaxes, c'est-à-dire possédant un seul axe optique. Pour une direction de propagation fixe, il existe une infinité d'indices de réfraction possibles variant entre deux valeurs extrêmes. Plus particulièrement nous étudierons des fibres biologiques déposées sur une lamelle de microscope. Ainsi l'axe optique de ces fibres sera contenue dans le plan.

Les changements d'états de polarisation pour une lumière totalement polarisée peuvent être décrits grâce au formalisme de Jones.

La notion d'état de polarisation est décrite par des vecteurs à 2 composantes appelés vecteur de Jones (voir equation (3.8)) tandis que l'évolution de cet état de polarisation est

décrite par une matrice de transfert appelée matrice de Jones.

$$(J) = \begin{pmatrix} E_x \\ E_y \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} E_{0x} \exp(i\Phi_x) \\ E_{0y} \exp(i\Phi_y) \end{pmatrix} \quad (3.8)$$

avec  $J$ , vecteur de Jones,  $E_{x,y}$ , champ électrique et  $\Phi_{x,y}$  phase de l'onde lumineuse.

Chaque dispositif élémentaire faisant évoluer l'état de polarisation est ainsi écrit sous la forme d'une matrice ( $2 \times 2$ ) dont les coefficients sont complexes (voir équation (3.9)) et une succession de dispositifs biréfringents linéaires se réduit à la transformation d'un état par un produit d'opérateurs linéaires élémentaires (voir équation (3.9)).

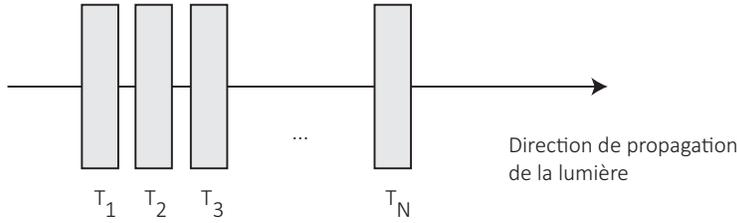


FIGURE 3.3 – Succession d'éléments optiques caractérisés par des matrices de Jones ( $T_i$ )

$$(J)_{out} = (T)(J)_{in} \quad (3.9)$$

avec  $(T) = (T_N) \dots (T_3)(T_2)(T_1)$ .

Le formalisme de Jones est bien adapté à l'étude de la lumière totalement polarisée mais quand il s'agit de lumière partiellement polarisée ou de l'étude de milieux dépolarisants, c'est le formalisme de Mueller qui est utilisé. Ce formalisme a, en plus l'avantage d'être basé sur une quantité directement mesurable expérimentalement : l'intensité.

Chaque dispositif élémentaire est écrit sous la forme d'une matrice ( $4 \times 4$ ) qui relie deux vecteurs de Stokes dont les coefficients sont réels (voir équation (3.10)).

$$(S) = \begin{pmatrix} S_0 \\ S_1 \\ S_2 \\ S_3 \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} I_{total} \\ I_H - I_V \\ I_{45^\circ} - I_{-45^\circ} \\ I_D - I_G \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} \langle E_{0H}^2 \rangle + \langle E_{0V}^2 \rangle \\ \langle E_{0H}^2 \rangle - \langle E_{0V}^2 \rangle \\ 2\text{Re} \langle E_{0H} E_{0V}^* \rangle \\ 2\text{Im} \langle E_{0H} E_{0V}^* \rangle \end{pmatrix} \quad (3.10)$$

avec  $S_i$  les paramètres du vecteur de Stokes ( $S$ ) associé à la polarisation considérée,  $I_{total}$  l'intensité totale,  $I_H$  et  $I_V$  et  $E_{0H}$  et  $E_{0V}$ , les intensités et champs respectifs des composantes linéaires polarisées horizontalement et verticalement dans le plan d'onde,  $I_{45^\circ}$  et  $I_{-45^\circ}$  les intensités respectives des composantes linéaires polarisées à  $45^\circ$  et  $-45^\circ$  dans le plan d'onde et  $I_D$  et  $I_G$  les intensités respectives des composantes polarisées circulairement

droite et gauche. Le symbole  $\langle \rangle$  désigne la moyenne temporelle sur le temps d'intégration du détecteur et sur la portion du faisceau vu par le détecteur.

Une succession de dispositifs biréfringents linéaires se réduit à la transformation d'un état par un produit d'opérateurs linéaires élémentaires : les matrices de Mueller composées de 16 composantes (4x4) réelles (voir équation (3.12)).

$$(S)_{out} = (M)(S)_{in} \quad (3.11)$$

$$(M) = (M_N)...(M_3)(M_2)(M_1) \quad (3.12)$$

Ce formalisme matriciel permet une caractérisation et une identification complète d'un milieu [86] en reliant deux vecteurs de Stokes. L'inconvénient majeur réside dans le fait que la détermination expérimentale des propriétés polarimétriques du milieu étudié implique en général 16 mesures et nécessite des décompositions matricielles pour être interprété [87]. Aussi, dans le cadre de l'étude d'échantillons dynamiques, cette approche peut paraître complexe et son formalisme un peu lourd surtout qu'il s'agit parfois de ne déterminer que quelques propriétés polarimétriques du milieu. En ce qui concerne notre étude, on fera l'hypothèse que les milieux ne sont pas dépolarisants, ce qui nous permettra d'utiliser le formalisme de Jones pour déterminer les différentes grandeurs d'intérêt. Les deux paramètres importants de ce formalisme sont l'intensité et la phase, grandeurs directement accessibles avec une mesure avec l'IDQL qui semble donc particulièrement adapté. L'idée est ici de réaliser une technique de mesure rapide compatible avec une mesure en temps réel de cellules dynamiques.

### 3.2.2 Les éléments biréfringents en biologie cellulaire et tissulaire

On sait que certaines structures fibreuses au sein de cellules et de tissus sont optiquement anisotropes. Au sein des cellules, les différentes fibres que l'on peut trouver au sein du cytosquelette par exemple sont anisotropes. Le cytosquelette est un réseau protéique très bien architecturé et très dynamique qui oscille entre polymérisation et dépolymérisation. Ses fonctions sont multiples, on peut citer par exemple l'organisation spatiale des composants cellulaires, la connection entre milieu extra- et intra-cellulaire avec les phénomènes d'endo- exocytose, la formation de protrusions membranaires qui permettent une migration de la cellule sur son support ou encore la séparation des chromosomes lors de la mitose [88].

Obtenir une information sur sa structure présente un grand intérêt pour l'étude des déplacements intracellulaires et des mécanismes de migration cellulaire.

Ce réseau est constitué de différentes fibres d'actine, de microtubules et de filaments intermédiaires.

L'actine est une protéine globulaire de 5,46 nm de diamètre qui existe sous deux formes : globulaire (actine G) et filamenteuse (actine F). Les filaments d'actine déterminent la forme

de la cellule et sont impliqués dans des processus d'exocytose (*i.e.* processus d'évacuation d'éléments hors de la cellule). Le diamètre des filaments d'actine, résultat d'une polymérisation d'actine globulaire, est d'environ 7 nm.

La seconde protéine impliquée dans ce réseau est la tubuline. Cette protéine est la protéine structurelle des microtubules. Elle existe également sous 2 formes  $\alpha$  et  $\beta$  qui s'associent pour former des dimères qui s'associent les uns à la suite des autres en protofilaments. On compte généralement 13 protofilaments par microtubule qui mesurent environ 20 nm de diamètre.

Les filaments intermédiaires, appelés ainsi en raison de leur diamètre d'environ 8 à 12 nm intermédiaire entre celui des filaments d'actine et celui des microtubules, représente le troisième type de filaments du réseau sont constitués de protéines fibrillaires assemblées de façon hélicoïdale. Ce sont les filaments les plus stables du cytosquelette, ils interviennent dans la solidité de la cellule et sont impliqués dans l'ancrage des organites cellulaires.

En raison de la taille de ces différents filaments et de la résolution du système optique réalisant l'imagerie, on aura surtout accès aux bundles de fibres qui se forment spontanément dans la cellule constitués surtout d'actine et de microtubules.

En ce qui concerne les tissus biologiques, le principal constituant anisotrope est le collagène. Le collagène est une protéine composée de trois chaînes alpha polypeptidiques associées et reliées par des liaisons hydrogènes et des liaisons covalentes. Le collagène a pour fonction de conférer aux tissus une résistance mécanique à l'étirement. Il en existe de différents types en fonction des acides aminés le composant. En effet, chaque type de collagène possède une structure propre et se retrouve avec des fonctions différentes dans des organes tels que les os, les tendons ou encore la peau.

L'utilisation de la polarisation dans des échantillons de tissus peut être utilisée afin d'obtenir un contraste qui permette d'étudier la structuration du réseau de collagène.

En effet, on sait que l'altération ou la dénaturation des tissus biologiques affecte leurs propriétés de diffusion en déstructurant les diffuseurs principaux des tissus (changement de tailles des noyaux des cellules par exemple). La diffusion modifiant les propriétés polarimétriques de l'onde incidente, l'information de dépolarisation doit permettre de discriminer les tissus cancéreux des tissus sains.

De plus, on sait que le développement de cancer est associée à une modification drastique de l'architecture et de la composition de la matrice extra-cellulaire et plus particulièrement du collagène la constituant [89].

Des études récentes ont montré l'intérêt de la polarisation comme potentiel outil de diagnostic pour différents maladies dermatologiques sur des biopsies épaisses [90] et pronostic de cancer [91].

### 3.2.3 Exemples de techniques de polarimétrie microscopique

Il existe différents dispositifs utilisant les propriétés de polarisation de la lumière. On peut citer différents travaux dont l'objet était de créer un contraste spécifique d'éléments anisotropes avec la microscopie à lumière polarisée en mesurant la valeur et l'orien-

tation du retard qui lui est associé. L'équipe d'Oldenbourg et al. a développé une technique [92], aujourd'hui commercialisée sous le nom du *LC-polscope Abrio* (Cri, Woburn, MA). La technique, basée sur l'utilisation de deux cristaux liquides combinés pour faire tourner la polarisation incidente sur l'échantillon a permis de réaliser des mesures sur plusieurs éléments biologiques biréfringents. Quatre images de l'échantillon acquises avec des polarisations différentes sont ensuite post-traitées afin d'en extraire le retard et l'orientation de l'axe optique de l'échantillon. Des éléments tels que des microtubules *in vitro* en bundle ou isolés et au sein de structures cellulaires appelées axonèmes [93] ont été étudiés. Ce système est également utilisé dans d'autres travaux [94]. Dans cet exemple, le retard et l'organisation des fibres de collagène et d'élastine ont été mis en évidence au sein de tissus aortiques dont l'épaisseur pouvait varier de quelques dizaines à plusieurs centaines de microns.

Un second système quantitatif de mesure de biréfringence [95] a été implémenté sur un microscope confocal. Il est basé sur l'utilisation d'un modulateur électro-optique et un compensateur de Babinet pour analyser la lumière émergeant de l'échantillon. Des images réalisées sur des échantillons de cristaux super-conducteurs et des éléments biologiques tels que des ailes de papillon ont été présentées.

On peut également citer une technique d'OCT (*pour* Tomographie par Cohérence Optique) sensible à la polarisation pour réaliser des images de biréfringence dans des tissus. Cette méthode couple l'imagerie contrastée et le sectionnement optique apporté par l'OCT et le contraste spécifique d'éléments biréfringents apporté par l'utilisation d'une illumination polarisée [96, 97].

Un autre type de dispositifs est constitué par les imageurs de Stokes et de Mueller. Les imageurs de Stokes utilisent une lumière non polarisée pour acquérir une image de chaque paramètre de Stokes. Un tel polarimètre a été réalisé en utilisant un analyseur de polarisation constitué de cristaux liquides [98]. Les imageurs de Mueller sont les dispositifs les plus complets pour l'étude des propriétés polarimétriques d'un échantillon. Les premiers dispositifs imageurs basés sur le formalisme de Mueller sont apparus au milieu des années 90 [99]. La technique, basée sur la mesure d'états de polarisation donnés permet de décrire totalement les caractéristiques polarimétriques d'un système. Le montage expérimental est plus complexe que pour les techniques évoquées précédemment. Un système de génération et d'analyse d'états de polarisation tous deux constitués d'une association de cristaux liquides et de polariseur sont nécessaires à la réalisation des 16 différentes mesures. Ce dispositif a connu depuis plusieurs développements [100, 101] et a montré dernièrement son intérêt dans le cadre d'études sur tissus épais avec une mise en évidence de différences de propriétés entre tissus sains et tissus cancéreux [102]. L'atout de cette technique, outre la possibilité de caractériser en totalité un échantillon, est sa capacité à prendre en compte les phénomènes de dépolarisation qui apparaissent dans des milieux épais tels que des tissus.

Ensuite, on peut citer les techniques de phase quantitative associées à une illumination et une détection polarisées qui permettent, en utilisant le formalisme de Jones, de réaliser

des mesures polarimétriques [103, 104, 105]. Différentes images (au moins 4 images sont nécessaires) avec des associations polariseur/analyseur différentes permettent de remonter à des mesures de retard. On peut ainsi accéder aux propriétés de biréfringence ou dichroïsme d'un milieu. Un nombre plus petit de mesures est nécessaire en comparaison avec l'utilisation du formalisme de Mueller, néanmoins, l'extraction d'information des matrices de Jones nécessite également une décomposition [106].

Certaines méthodes rapides qui permettent une extraction des propriétés de biréfringence d'un échantillon ont été proposées dernièrement [107, 108]. L'inconvénient de ces techniques est qu'elles requièrent des *a priori* sur l'échantillon et peu d'entre elles sont assez rapides pour être compatibles avec une imagerie d'échantillons vivants. Un montage expérimental [109], basé sur le même principe que le nôtre et que l'on détaillera plus tard, a permis l'étude d'échantillons biologiques vivants. Des cartographies de retard de cellules ont été présentées.

### 3.3 Mesure de biréfringence par analyse de front d'onde

Dans cette partie, on se propose de montrer l'intérêt d'utiliser notre technique de phase quantitative dans le cadre de l'imagerie d'éléments biréfringents.

La mesure de vecteurs de Stokes avec différentes polarisations serait possible grâce à l'IDQL. Cependant, dans le cadre de notre étude, on cherche à réaliser un imageur rapide et spécifique pour la détection et l'identification d'éléments biréfringents.

Une mesure de retard ainsi qu'une cartographie d'orientation des éléments biréfringents sera réalisée à partir d'un stack (*i.e.* ou empilement) de mesures de déphasage de différentes polarisations sans utiliser de détection polarisée. En effet, on utilisera dans la suite un unique polariseur et pas d'analyseur après l'échantillon. La mesure permet de déterminer des valeurs de retard de biréfringence de façon rapide afin d'être compatible avec l'étude d'échantillons biologiques vivants.

Dans la suite, on commencera par établir l'expression du front d'onde arrivant à l'analyseur dans le cas d'un front d'onde polarisé. On montrera que l'OPD qui sera mesurée est sinusoidale dans le cas de faibles déphasages. On établira ensuite l'expression du champ électrique en sortie d'un élément biréfringent, montrant que l'OPD est principalement suivant la direction de polarisation incidente. Les différentes hypothèses amenant à ces conclusions et leur domaine de validité seront vérifiés grâce à des outils de simulation.

#### 3.3.1 Mesure d'un front d'onde en lumière polarisée

Afin de comprendre ce qu'entraîne l'utilisation d'une lumière polarisée avec l'analyseur de front d'onde, établissons dans un premier temps l'équation de l'interférogramme obtenu à une dimension dans le cadre d'une illumination polarisée.

On rappelle l'équation (1.11) établie dans la partie 1.2.4.3, en notant le front d'onde *OPD*

au lieu de  $W$ .

$$I = I_0 + I_x \cdot \left[ \cos \left( \frac{2\pi}{p} \left( x - z_{pas} \frac{\partial OPD}{\partial x} \right) \right) \right] \quad (3.13)$$

On redéfinit l'expression de l' $OPD(\theta)$  (équation 2.1) établie dans la partie 2.2 lorsqu'elle est mesurée dans des conditions d'illumination polarisée avec un indice de réfraction variant en fonction de la direction de polarisation :

$$OPD(\theta) = \int_0^t (n(\theta) - n_{milieu}) \cdot dz \quad (3.14)$$

avec  $\theta$  l'angle de polarisation de l'onde plane par rapport au système d'axes du laboratoire,  $n(\theta)$  et  $n_{milieu}$  les indices de réfraction locaux de l'échantillon et du milieu environnant et  $t$  l'épaisseur physique le long de l'axe optique.

Pour des raisons de lisibilité des équations, on définit une nouvelle base orthonormée  $(\vec{u}^{\parallel}; \vec{u}^{\perp})$  qui suit le vecteur champ électrique de l'onde plane incidente polarisée linéairement :  $\vec{E}_{in} = \|\vec{E}_{in}\| \cdot \vec{u}^{\parallel}$ . Après propagation à travers un matériau biréfringent, le champ

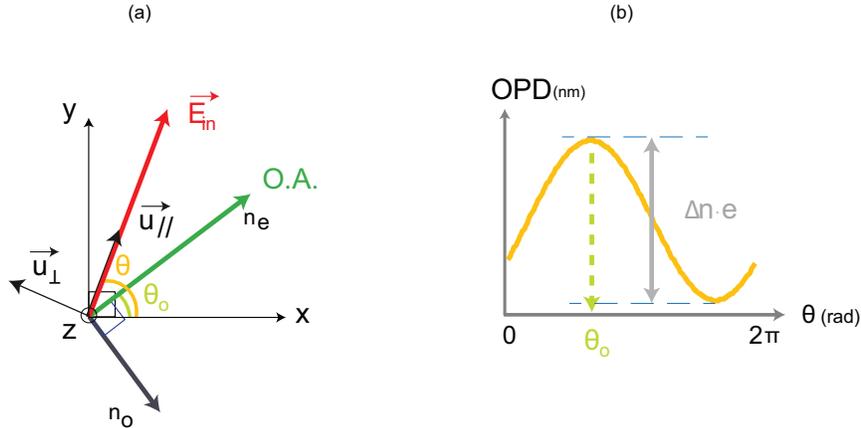


FIGURE 3.4 – Illustration du principe. (a) Représentation schématique des différents axes du système et (b) de la variation de l'OPD avec l'orientation de la polarisation respectivement à une valeur initiale pour un objet biréfringent linéaire uniaxe.

électrique en sortie du matériau s'écrit :  $\vec{E} = \|E^{\parallel}\| \cdot \vec{u}^{\parallel} + \|E^{\perp}\| \cdot \vec{u}^{\perp}$  avec  $\vec{u}^{\perp} = \vec{z} \wedge \vec{u}^{\parallel}$  (voir Figure 3.4(a)).

On sait que deux faisceaux polarisés de façon orthogonale ne peuvent pas interférer l'un avec l'autre. L'interférogramme final est donc la somme incohérente des interférogrammes générés par les deux champs électriques  $\vec{E}^{\parallel}$  et  $\vec{E}^{\perp}$  et l'intensité finale peut s'écrire :  $I = E^{\perp 2} + E^{\parallel 2}$ .

Dans le cas où le faisceau est homogène en polarisation, le front d'onde mesuré par l'analyseur de front d'onde est correct. Ceci signifie que le système est insensible à la polarisation. Au niveau du réseau, on est en incidence normale, les ordres de diffraction sont indépendants de la polarisation en amplitude et en polarisation.

Utilisant l'équation (3.13), on réécrit les équations des interférogrammes  $I^{\parallel}$  et  $I^{\perp}$  :

$$I^{\parallel/\perp} = I_0^{\parallel/\perp} + I_x^{\parallel/\perp} \cdot \left[ \cos \left( \frac{2\pi}{pas} \left( x - z \frac{\partial OPD^{\parallel/\perp}}{\partial x} \right) \right) \right]. \quad (3.15)$$

L'intensité totale reçue sur le détecteur est la somme des intensités  $I_x^{\parallel}$  et  $I_x^{\perp}$  :

$$\begin{aligned} I_{tot} = I_0^{\parallel} + I_0^{\perp} + \frac{1}{2} \left[ \exp \left( \frac{2i\pi x}{pas} \right) \cdot \left( I_x^{\parallel} \cdot \exp \left( \frac{-2i\pi z}{pas} \cdot \frac{\partial OPD^{\perp}}{\partial x} \right) \right. \right. \\ \left. \left. + I_x^{\perp} \cdot \exp \left( \frac{-2i\pi z}{pas} \cdot \frac{\partial OPD^{\perp}}{\partial x} \right) \right) \right. \\ \left. + \exp \left( \frac{-2i\pi x}{pas} \right) \cdot \left( I_x^{\parallel} \cdot \exp \left( \frac{2i\pi z}{pas} \cdot \frac{\partial OPD^{\perp}}{\partial x} \right) \right. \right. \\ \left. \left. + I_x^{\perp} \cdot \exp \left( \frac{2i\pi z}{pas} \cdot \frac{\partial OPD^{\perp}}{\partial x} \right) \right) \right] \end{aligned} \quad (3.16)$$

L'interférogramme est analysé grâce à la relation (1.12) établie au Chapitre 1.2.4.3 :

$$\begin{aligned} \mathcal{FT}(I) = \mathcal{FT}(I_0^{\parallel} + I_0^{\perp}) + \frac{1}{2} \cdot \delta \left( \frac{1}{p} \right) \otimes \mathcal{FT} \left[ \left( I_x^{\parallel} \cdot \exp \left( \frac{-2i\pi z}{pas} \cdot \frac{\partial OPD^{\perp}}{\partial x} \right) \right. \right. \\ \left. \left. + I_x^{\perp} \cdot \exp \left( \frac{-2i\pi z}{pas} \cdot \frac{\partial OPD^{\perp}}{\partial x} \right) \right) \right] + C.C \end{aligned} \quad (3.17)$$

avec C.C pour complexe conjugué.

De la même façon que précédemment, une démodulation de l'interférogramme autour des fréquences spatiales de l'ordre zéro et  $1/pas$  nous permet d'extraire l'intensité et le gradient de l'OPD suivant la direction  $\vec{x}$ . Le gradient local de l'OPD total peut être exprimé en fonction des gradients suivant les polarisations  $\parallel$  et  $\perp$  :

$$\nabla OPD_{mesuré} = \frac{1}{\alpha} \cdot \text{arg} \left( \|E^{\parallel}\|^2 \cdot e^{i\alpha \nabla OPD^{\parallel}} + \|E^{\perp}\|^2 \cdot e^{i\alpha \nabla OPD^{\perp}} \right) \quad (3.18)$$

avec  $\nabla OPD^{\parallel}$  et  $\nabla OPD^{\perp}$  les gradients de l'OPD mesurés suivant les directions parallèle et perpendiculaire par rapport à la polarisation incidente et  $\alpha$  un paramètre en relation avec les caractéristiques de l'analyseur de front d'onde valant  $2\pi z_p/pas$ , on rappelle que  $z_p$  est la distance entre le réseau de diffraction et  $pas$  le pas du réseau.

Dans un premier temps, on cherche à exprimer  $\nabla OPD$  de façon plus simple en fonction de  $\nabla OPD^{\parallel}$  et de  $\nabla OPD^{\perp}$  :

$$E_{tot} = E^{\parallel} e^{i\nabla OPD^{\parallel}} + E^{\perp} e^{i\nabla OPD^{\perp}} \quad (3.19)$$

$$E_{tot} = e^{i \frac{\alpha(\nabla OPD^{\parallel} + \nabla OPD^{\perp})}{2}} \left( I^{\parallel} e^{i \frac{\alpha(\nabla OPD^{\parallel} - \nabla OPD^{\perp})}{2}} + I^{\perp} e^{-i \frac{\alpha(\nabla OPD^{\parallel} - \nabla OPD^{\perp})}{2}} \right) \quad (3.20)$$

En utilisant le développement suivant :  $Ae^{i(x-y)} + Be^{i(x+y)} = (A+B)\cos(x-y) + i(A-B)\sin(x-y)$ , on réécrit l'expression précédente :

$$E_{tot} = e^{i \frac{\alpha(\nabla OPD^{\parallel} + \nabla OPD^{\perp})}{2}} \left[ (I^{\parallel} + I^{\perp}) \cos\left(\frac{\alpha(\nabla OPD^{\parallel} - \nabla OPD^{\perp})}{2}\right) + i(I^{\parallel} - I^{\perp}) \sin\left(\frac{\alpha(\nabla OPD^{\parallel} - \nabla OPD^{\perp})}{2}\right) \right] \quad (3.21)$$

On prend l'argument du champ E défini précédemment,

$$arg(E_{tot}) = \frac{(\nabla OPD^{\parallel} + \nabla OPD^{\perp})}{2} + \quad (3.22)$$

$$\arctan\left(\frac{I^{\parallel} - I^{\perp}}{I^{\parallel} + I^{\perp}} \cdot \frac{\sin\left(\alpha(\nabla OPD^{\parallel} - \nabla OPD^{\perp})/2\right)}{\cos\left(\alpha(\nabla OPD^{\parallel} - \nabla OPD^{\perp})/2\right)}\right) \quad (3.23)$$

Essayons de simplifier cette expression dans un premier cas où le retard mesuré des éléments est faible, c'est à dire dans le cas où  $1/2(\nabla OPD^{\parallel} - \nabla OPD^{\perp})$ , noté dans la suite  $\Delta$  pour plus de lisibilité,  $\ll 1$ . Cette hypothèse est valide dans le cas d'échantillons de cellules ou de fibres, les valeurs typiques de retard étant de l'ordre de la dizaine de nanomètres avec des variations lentes, le gradient est donc très faible. Calculons son domaine de validité, c'est-à-dire que vaut  $S = \arctan\left(\frac{1-\kappa}{1+\kappa} \tan \Delta\right)$  avec  $\Delta \ll 1$  (on note  $\kappa$  le rapport  $I^{\perp}/I^{\parallel}$ ). On évalue pour cela la valeur limite de  $\Delta$  à l'ordre supérieur.

$$S = \arctan\left(\frac{1-\kappa}{1+\kappa} \left(\Delta + \frac{\Delta^3}{3}\right)\right) \quad (3.24)$$

$$S \approx \frac{1-\kappa}{1+\kappa} \left(\Delta + \frac{\Delta^3}{3}\right) - \frac{1}{3} \left(\frac{1-\kappa}{1+\kappa}\right)^3 \left(\Delta - \frac{\Delta^3}{3}\right)^3 + o(\Delta^3) \quad (3.25)$$

$$S \approx \left(\frac{1-\kappa}{1+\kappa}\right) \Delta \left[1 + \frac{\Delta^2}{3} \left[1 - \left(\frac{1-\kappa}{1+\kappa}\right)^2\right]\right] + o(\Delta^3) \quad (3.26)$$

Au 1er ordre non nul, cette relation permet d'établir une expression de  $\nabla OPD_{mesuré}$  :

$$\nabla OPD_{mesuré} \approx \frac{(\nabla OPD^{\parallel} + \nabla OPD^{\perp})}{2} + \left(\frac{I^{\parallel} - I^{\perp}}{I^{\parallel} + I^{\perp}}\right) \cdot \Delta \quad (3.27)$$

Et,

$$\nabla OPD_{mesuré} \approx \frac{I^{\parallel} \nabla OPD^{\parallel} + I^{\perp} \nabla OPD^{\perp}}{I^{\parallel} + I^{\perp}}. \quad (3.28)$$

On voit que la valeur du gradient de l'OPD mesuré est une valeur moyenne des gradients suivant les 2 directions  $\parallel$  et  $\perp$ , chacune étant pondérée respectivement par la composante intensité correspondante.

Dans le cas où l'intensité suivant une des deux directions est faible, la contribution de cette composante à l'OPD sera faible. On verra par la suite que dans le cas de retards faibles, le signal mesuré sera surtout dû à la composante parallèle à la direction de polarisation incidente.

On peut négliger le terme d'ordre 3 quand :

$$\frac{\Delta^2}{3} \left( \frac{(1 - \kappa)^2 - (1 + \kappa)^2}{(1 + \kappa)^2} \right) \ll 1 \quad (3.29)$$

$$\frac{\Delta^2}{3} \left( \frac{4\kappa}{(1 + \kappa)^2} \right) \ll 1 \quad (3.30)$$

En développant l'expression précédente,

$$\Delta^2 \ll \frac{3}{4} \frac{(1 + \kappa)^2}{\kappa} \quad (3.31)$$

Cette équation dépend de  $\kappa$ . Cependant, comme  $0 \leq \kappa \leq 1$  par définition, on peut estimer les bornes de ses valeurs. On utilise la fonction  $\mathcal{F}$  telle que  $\mathcal{F} = \frac{(1+\kappa)^2}{\kappa}$ . On cherche le minimum de cette fonction. Pour cela, on calcule sa dérivée notée  $\mathcal{F}'$ .

$$\mathcal{F}' = \frac{2(1 + \kappa)\kappa - (1 + \kappa)^2}{\kappa^2} \quad (3.32)$$

$$\mathcal{F}' = \frac{(1 + \kappa)(\kappa - 1)}{\kappa^2} \quad (3.33)$$

Cette fonction s'annule pour  $\kappa=1$  et vaut 4 en  $\kappa=1$ . On a donc  $\Delta \ll \sqrt{3}$  et on peut écrire :

$$\alpha \nabla(OPD^{\parallel} - \nabla OPD^{\perp}) \ll \sqrt{3}. \quad (3.34)$$

$$\nabla(OPD^{\parallel} - \nabla OPD^{\perp}) \ll \frac{\sqrt{3} pas}{2\pi z_p}. \quad (3.35)$$

En effectuant l'application numérique avec les paramètres *pas* valant 29,6  $\mu\text{m}$  et  $z_p$  valant 2 mm, on trouve que la différence maximale entre les gradients de l'OPD doit être

inférieure à une variation de 173 nm entre 2 pixels de phase, ce qui est le cas en ce qui concerne en général les échantillons biologiques qui possèdent une variation d'OPD lente. Dans le cas où la variation entre 2 pixels serait trop forte, on peut également ajuster le grandissement et ainsi étaler l'information sur plus de pixels pour avoir un gradient local plus faible.

Essayons maintenant de simplifier cette expression dans un autre cas où  $\kappa \ll 1$ , c'est à dire dans le cas où  $I^\perp \ll I^\parallel$  et  $\Delta$  quelconque. Si  $\kappa \ll 1$ , alors on peut écrire :

$$\frac{(1 - \kappa)}{(1 + \kappa)} = 1 - 2\kappa + o(\kappa) \quad (3.36)$$

En utilisant la relation  $\arctan(xo + \epsilon) = \arctan xo + \frac{\epsilon}{1+xo^2}$ , on peut écrire :

$$S = \arctan\left(\frac{1 - \kappa}{1 + \kappa} \tan \Delta\right) = \arctan\left(\tan \Delta - 2\kappa \tan \Delta\right) \quad (3.37)$$

$$S = \Delta + \frac{-2\kappa \tan \Delta}{1 + \tan^2 \Delta} \quad (3.38)$$

$$S = \Delta - 2\kappa \left(\frac{\tan \Delta}{1 + \tan^2 \Delta}\right) \quad (3.39)$$

Avec

$$1 + \tan^2 \Delta = \frac{\cos^2 \Delta + \sin^2 \Delta}{\cos^2 \Delta} \quad (3.40)$$

Finalement,

$$S = \Delta - \kappa \sin 2\Delta \quad (3.41)$$

Le domaine de validité de l'approximation réalisée, pour pouvoir considérer que  $\nabla OPD_{mesuré} = \nabla OPD^\parallel$  est le suivant :

$$\nabla OPD^\parallel \gg \frac{I^\perp}{I^\parallel} \sin(\nabla OPD^\parallel - \nabla OPD^\perp) \quad (3.42)$$

Cette formule sera interprétée plus tard dans le cas de la mesure de biréfringence.

### 3.3.2 Mesure de biréfringence

#### 3.3.2.1 Établissement de l'expression du champ électrique en sortie d'un élément biréfringent

Dans cette partie, on cherche à exprimer le champ électrique mesuré en fonction des propriétés optiques du milieu que l'on veut imager et plus particulièrement en fonction

des polarisations parallèle et perpendiculaire du champ arrivant au détecteur. On rappelle que l'on s'intéressera dans la suite uniquement à des milieux biréfringents linéaires uniaxes et peu épais de façon à négliger le décalage dû à la réfraction à l'entrée du milieu. Ceci, notamment pour des raisons de simplicité de modèle et parce que les éléments qui seront étudiés par la suite sont majoritairement linéaires uniaxes.

On fait l'hypothèse que le champ électrique se propage à travers le milieu suivant  $\vec{z}$  et on utilise la représentation du champ électrique suivante :  $\vec{E} = [E_x, E_y, 0]$ . L'échantillon est supposé linéairement biréfringent avec un axe optique contenu dans le plan XY et orienté avec un angle  $\theta_o$  respectivement à l'axe horizontal  $\vec{x}$  du repère du laboratoire (voir Figure 3.4(a)). La biréfringence est considérée constante le long de l'axe  $\vec{z}$ .

On utilise le formalisme de Jones pour décrire le champ électrique de sortie et les différentes étapes qui permettent sa détermination. Ainsi qu'on l'a défini dans la partie 3.2.1, les champs électriques en entrée et en sortie sont reliés par la relation suivante :

$$\vec{E}_{out} = (J) \cdot \vec{E}_{in} \quad (3.43)$$

avec  $\vec{E}_{in}$  le champ électrique incident,  $(J)$  une matrice reliée à la matrice de Jones ( $J_{\text{échantillon}}$ ) de l'élément dans le plan principal contenant son axe optique telle que

$$(J) = (R - (\theta - \theta_o)) \cdot (J_{\text{échantillon}}) \cdot (R(\theta - \theta_o))$$

et  $R$  la matrice de rotation définie par :

$$R(\theta - \theta_o) = \begin{pmatrix} \cos(\theta - \theta_o) & -\sin(\theta - \theta_o) \\ \sin(\theta - \theta_o) & \cos(\theta - \theta_o) \end{pmatrix} \quad (3.44)$$

avec le système d'axes de l'échantillon relié à celui du laboratoire par une rotation d'angle  $\theta_o$ . Dans le plan  $(\vec{x}, \vec{y})$  la matrice de Jones  $J_{\text{échantillon}}$  d'un échantillon homogène et biréfringent d'épaisseur  $e$ , qui est un retardateur linéaire s'écrit :

$$(J_{\text{échantillon}}) = \begin{pmatrix} e^{ik\delta o} & 0 \\ 0 & e^{ik\delta e} \end{pmatrix} \quad (3.45)$$

avec  $e^{ik\delta o}$  et  $e^{ik\delta e}$  tels que  $k = \frac{2\pi}{\lambda}$ ,  $\delta o = (n_o - n_{\text{milieu}}) \times e$  et  $\delta e = (n_e - n_{\text{milieu}}) \times e$  avec  $\lambda$  la longueur d'onde moyenne,  $e$  l'épaisseur mécanique,  $n_e$  et  $n_o$  respectivement les indices de réfraction extraordinaires et ordinaires qui définissent la biréfringence d'un échantillon uniaxe de la façon suivante  $\Delta n = (n_e - n_o)$ .

Le retard peut s'écrire :  $\Delta\delta = \delta e - \delta o = \Delta n \times e$ .

En utilisant les notations  $\alpha = e^{ik\delta o}$  et  $\beta = e^{ik\delta e}$  pour alléger les écritures, on peut écrire dans le système  $(u^{\parallel}, u^{\perp})$  :

$$(J) = \left(\frac{\alpha + \beta}{2}\right) \begin{pmatrix} 1 & 0 \\ 0 & 1 \end{pmatrix} + \left(\frac{\alpha - \beta}{2}\right) \begin{pmatrix} \cos 2(\theta - \theta_o) & \sin 2(\theta - \theta_o) \\ \sin 2(\theta - \theta_o) & -\cos 2(\theta - \theta_o) \end{pmatrix} \quad (3.46)$$

On considère maintenant que  $\vec{E}_{in} = \|\vec{E}_{in}\| \cdot [1, 0]$  dans le système d'axes  $(\vec{u}^{\parallel}; \vec{u}^{\perp})$ . L'équation (3.43) donne :

$$\vec{E}_{out} = \|\vec{E}_{in}\| \left[ \left( \frac{\alpha + \beta}{2} \right) \begin{pmatrix} 1 \\ 0 \end{pmatrix} + \left( \frac{\alpha - \beta}{2} \right) \begin{pmatrix} \cos 2(\theta - \theta_0) \\ \sin 2(\theta - \theta_0) \end{pmatrix} \right] \quad (3.47)$$

En utilisant les relations suivantes,  $\left( \frac{\alpha + \beta}{2} \right) = \cos \left( \frac{k\Delta\delta}{2} \right) e^{\frac{ik(\delta_o + \delta_e)}{2}}$  et  $\left( \frac{\alpha - \beta}{2} \right) = i \sin \left( \frac{k\Delta\delta}{2} \right) e^{\frac{ik(\delta_o + \delta_e)}{2}}$ , on peut écrire :

$$\begin{aligned} \vec{E}_{out} = \|\vec{E}_{in}\| e^{\frac{ik(\delta_o + \delta_e)}{2}} \cdot \left[ \left( \cos \left( \frac{k\Delta\delta}{2} \right) + i \sin \left( \frac{k\Delta\delta}{2} \right) \cos 2(\theta - \theta_0) \right) \vec{u}^{\parallel} \right. \\ \left. + \left( i \sin \left( \frac{k\Delta\delta}{2} \right) \sin 2(\theta - \theta_0) \right) \vec{u}^{\perp} \right] \quad (3.48) \end{aligned}$$

On obtient ainsi l'expression du champ électrique en sortie de l'échantillon et qui arrive au détecteur.

Quand  $(\theta - \theta_0) = 0^\circ$  ou  $(\theta - \theta_0) = 90^\circ$ , l'analyse de l'équation (3.48) montre que le champ en sortie possède la même polarisation que le champ en entrée mais qu'il a été déphasé d'une phase correspondant respectivement à un OPD ordinaire et extraordinaire. En résumé, si la polarisation est constante et parallèle à l'un ou l'autre des axes privilégiés de l'élément biréfringent, on observera uniquement un déphasage entre les 2 composantes du champ et l'OPD mesuré sera égal à l'OPD défini par les indices extraordinaire ou ordinaire. L'OPD varie de façon sinusoïdale entre 2 valeurs :  $OPD_{extraordinaire}$  et  $OPD_{ordinaire}$ . On note que la composante selon  $\vec{u}^{\perp}$  est un imaginaire pur dont la phase est toujours égale à  $\pi/2$ .

Pour d'autres valeurs du terme  $(\theta - \theta_0)$ , il n'est pas possible de donner une formule analytique simple de l'OPD mesuré et l'interprétation du front d'onde n'est pas triviale. On tâchera par la suite d'établir des relations simples dans le cas particulier de biréfringence faible ( $< 100$  nm).

### 3.3.2.2 Intensité relative des deux composantes de polarisation

On établit l'expression de l'intensité suivant  $\vec{u}^{\parallel}$  à partir de l'équation (3.48).

$$I_{out}^{\parallel} = I_0 \left[ \cos^2 \left( \frac{k\Delta\delta}{2} \right) + \sin^2 \left( \frac{k\Delta\delta}{2} \right) \cos^2(2(\theta - \theta_0)) \right] \quad (3.49)$$

$$I_{out}^{\perp} = I_0 \left[ 1 - \sin^2 \left( \frac{k\Delta\delta}{2} \right) \sin^2(2(\theta - \theta_0)) \right] \quad (3.50)$$

$$I_{out}^{\parallel} = I_0 \left[ 1 - \frac{1}{2} \sin \left( \frac{k\Delta\delta}{2} \right) (1 - \cos(4(\theta - \theta_0))) \right] \quad (3.51)$$

L'intensité qui sera mesurée est toujours sinusoïdale. Ceci permet de réaliser des mesures de grands retards de biréfringence. Cependant, en ce qui concerne la mesure de faibles valeurs de retard, la mesure de phase est plus adaptée car sa variation est linéaire avec l'épaisseur contrairement à l'intensité dont la variation est quadratique.

On peut évaluer les contributions des intensités  $I_{out}^{\parallel}$  et  $I_{out}^{\perp}$  à l'intensité totale  $I_{out}$ . On représente ces intensités normalisées calculées à partir de l'équation (3.48) en fonction de  $\theta$  pour différentes valeurs de retard  $\Delta\delta$  afin de voir la répartition de l'intensité totale suivant les 2 directions. Les résultats sont présentés dans la Figure 3.5. On constate que jusqu'à 3 microns de retard, l'intensité est majoritairement suivant  $E_{out}^{\parallel}$  avec plus de 99% de l'intensité totale suivant cette direction. Pour un retard  $\Delta\delta$  valant 10 microns, on commence à avoir des valeurs de  $\theta$  pour lesquelles la composante  $I_{out}^{\perp}$  de l'intensité vaut 20% de l'intensité totale.

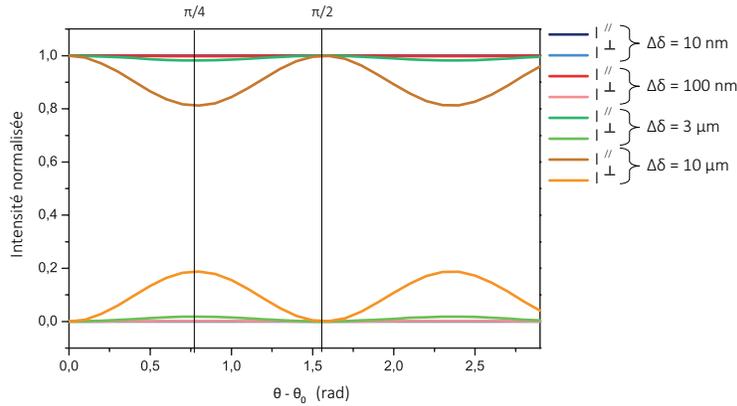


FIGURE 3.5 – Représentation de l'intensité normalisée du champ électromagnétique suivant les directions parallèle et perpendiculaire en fonction de  $\theta$ .

Grâce à ce résultat, on peut considérer que le champ  $E_{out}^{\vec{}}$  pour des échantillons faiblement retardants est essentiellement orienté suivant  $u^{\parallel}$ .

On fait maintenant l'hypothèse assez forte mais justifiée par la précédente étude que pour des objets de faible retard (inférieur au micron), dans le cas où il n'y a pas de transfert d'une polarisation à l'autre, le second terme de l'équation (3.48) selon  $u^{\perp}$  peut être négligé dans la mesure d'OPD puisque la composante de l'intensité suivant la direction orthogonale à la polarisation incidente est très faible. L'OPD mesuré étant pondéré par la composante intensité correspondante (voir résultat de la partie 3.3.1).

Expérimentalement, suivre la polarisation incidente est compliqué et peut être une source additionnelle de bruit. Pour éviter cela, on réalise cette hypothèse qui nous permettra de réaliser des mesures de retard sans détection polarisée. On vérifiera la validité de cette hypothèse grâce à une simulation au niveau de la Partie 3.3.2.5.

Dans la suite, on cherchera à calculer l'influence de la composante perpendiculaire du champ électrique sur la mesure de la phase. On définira les conditions expérimentales pour lesquelles on négligera l'effet de cette composante sur les mesures de phase.

### 3.3.2.3 Phase de l'onde selon $\vec{u}^{\parallel}$

Considérons uniquement l'expression du champ  $E_{out}^{\parallel}$  :

$$E_{out}^{\parallel} = \|E_{in}^{\parallel}\| e^{\frac{ik(\delta o + \delta e)}{2}} \left( \cos\left(\frac{k\Delta\delta}{2}\right) + i \sin\left(\frac{k\Delta\delta}{2}\right) \cos 2(\theta - \theta_0) \right) \vec{u}^{\parallel}. \quad (3.52)$$

On veut déterminer la variation de l'OPD $^{\parallel}$ , ce qui revient à chercher l'argument de l'amplitude complexe  $\omega$  du champ  $E_{out}^{\parallel}$ . On se place dans le cas où  $\Delta\delta$  est faible pour lequel on espère une variation non seulement périodique mais aussi sinusoidale de l'angle de polarisation. Pour cela, nous allons déterminer la partie réelle de  $\psi$  telle que  $\psi \in \mathbb{C}$  qui sera identifiée avec la phase du champ  $E_{out}^{\parallel}$ .

$$\cos(\omega) + i \sin(\omega) \cos(\zeta) \equiv \exp(i\psi) \quad (3.53)$$

avec  $\alpha = \frac{2\pi \Delta\delta}{\lambda 2}$ .

On écrit  $\psi$  comme un développement limité en  $\omega$ .

$$\psi = \gamma\omega + \epsilon\omega^2 + \eta\omega^3, \quad (3.54)$$

avec  $\gamma, \epsilon$  et  $\eta$  des nombres complexes à déterminer.

Il faut résoudre l'équation reliant les développements limités de  $\psi$  et du 1er terme de l'équation(3.53) :

$$1 - \frac{\omega^2}{2} + i\left(\omega - \frac{\omega^3}{6}\right) \cos \zeta + o(\omega^3) = 1 + i\psi - \frac{\psi^2}{2} - i\frac{\psi^3}{6}. \quad (3.55)$$

En remplaçant  $\psi$  par son expression (equation (3.54)) dans l'équation (3.55), on écrit :

$$1 - \frac{\omega^2}{2} + i\left(\omega - \frac{\omega^3}{6}\right) \cos \beta + o(\omega^3) = 1 + i(\gamma\omega + \epsilon\omega^2 + \eta\omega^3) - \frac{(\gamma\omega + \epsilon\omega^2 + \eta\omega^3)^2}{2} - i\frac{(\gamma\omega + \epsilon\omega^2 + \eta\omega^3)^3}{6} + o(\omega^3) \quad (3.56)$$

On développe l'expression 3.57 en  $\alpha$ ,

$$1 - \frac{\omega^2}{2} + i\left(\omega - \frac{\omega^3}{6}\right) \cos \zeta + o(\omega^3) = 1 + i\gamma\omega + i\epsilon\omega^2 + i\eta\omega^3 - \frac{1}{2}[\gamma^2\omega^2 + \epsilon\gamma\omega^3] - \frac{i}{6}[\gamma^3\omega^3] + o(\omega^3) \quad (3.57)$$

et en identifiant les différents termes de puissance de  $\omega$ , on obtient les expressions suivantes pour  $\gamma$ ,  $\epsilon$  et  $\eta$  :

$$\left\{ \begin{array}{l} \gamma = \cos \zeta \\ \epsilon = \frac{i \sin^2 \zeta}{2} \\ \eta = \frac{\sin^2 \beta \cos \zeta}{12}. \end{array} \right.$$

On obtient alors l'expression de  $\cos(\omega) + i \sin(\omega) \cos(\zeta)$  sous forme exponentielle :

$$\cos(\omega) + i \sin(\omega) \cos(\zeta) \approx \exp\left(\frac{\omega^2 \sin(\zeta)^2}{2} + o(\omega^3)\right) \exp i(\omega \cos(\zeta) + \frac{\omega^3}{12} \cos(\zeta) \sin(\zeta)^2 + o(\omega^3)) \quad (3.58)$$

Finalement, en considérant que  $\text{Re}(\psi) = \Phi^{\parallel}$

$$\Phi^{\parallel} = \omega \cos(\zeta) + \frac{\omega^3}{12} \cos(\zeta) \sin(\zeta)^2 + o(\omega^3) \quad (3.59)$$

$$\Phi^{\parallel} = \omega \cos(\zeta) + \frac{\omega^3}{12} (\cos(\zeta) - \cos(\zeta)^3) + o(\omega^3) \quad (3.60)$$

On écrit  $\cos(\zeta)^3$  en fonction de  $\cos(\zeta)$  et  $\cos(3\zeta)$  :

$$\Phi^{\parallel} = \left(\omega + \frac{\omega^3}{48}\right) \cos(\zeta) - \frac{\omega^3}{48} \cos(3\zeta) + o(\omega^3). \quad (3.61)$$

En remplaçant  $\omega$  et  $\zeta$  par leurs expressions respectives dans l'expression précédente, on obtient :

$$OPD^{\parallel} = \left(\frac{\Delta\delta}{2} + \frac{\pi^2 \Delta\delta^3}{\lambda^2 96}\right) \cos(2(\theta - \theta_0)) - \left(\frac{\pi^2 \Delta\delta^3}{\lambda^2 96}\right) \cos(6(\theta - \theta_0)) + o(\Delta\delta^3). \quad (3.62)$$

En conclusion, on peut considérer que l'OPD<sup>||</sup> est purement sinusoïdal de période  $\pi$  si  $\left(\frac{\Delta\delta^3 \pi^2}{96 \lambda^2}\right)$  est négligeable devant  $\frac{\Delta\delta}{2}$ . Elle le reste tant que :  $\Delta\delta \ll \frac{4\sqrt{3}\lambda}{\pi}$ , avec  $\frac{4\sqrt{3}}{\pi} \approx 2, 2$ .

En conclusion, pour des valeurs de retard telles que  $\Delta\delta < 2, 2\lambda$ , l'OPD varie comme une fonction sinusoïdale de l'angle de polarisation incident :

$$OPD_{mesuré}(\theta) = \frac{(\delta o + \delta e)}{2} + \left(\frac{\Delta\delta}{2}\right) \cos 2(\theta - \theta_0). \quad (3.63)$$

Cela va nous permettre de mesurer  $\Delta\delta$  et  $\theta_0$  en faisant varier  $\theta$ .

### 3.3.2.4 Domaine de validité pour lequel la composante orthogonale est négligeable. Ordre de grandeur

On a montré précédemment (équation 3.42) que l'on pouvait négliger la composante du champ selon  $\vec{u}^{\perp}$  dans le cas où  $I_{out}^{\parallel} \gg I_{out}^{\perp}$ .

Étudions le domaine de validité de cette hypothèse.

On reprend l'expression du gradient de l'OPD mesurée (équation (3.42)) :

$$\nabla OPD_{mesuré} = \nabla OPD_{out}^{\parallel} - \frac{I_{out}^{\perp}}{I_{out}^{\parallel}} \sin(\nabla OPD_{out}^{\parallel} - \nabla OPD_{out}^{\perp}) \quad (3.64)$$

avec

$$\begin{cases} OPD^{\parallel} = \frac{(\delta o + \delta e)}{2} + \left(\frac{\Delta\delta}{2}\right) \cos 2(\theta - \theta_0) \\ OPD^{\perp} = \frac{(\delta o + \delta e)}{2} + \frac{\pi}{2} \end{cases}$$

et

$$\begin{cases} I^{\parallel} = \cos^2\left(\frac{k\Delta\delta}{2}\right) + \sin^2\left(\frac{k\Delta\delta}{2}\right) \sin^2 2(\theta - \theta_0) \\ I^{\perp} = \sin^2\left(\frac{k\Delta\delta}{2}\right) \sin^2 2(\theta - \theta_0) \end{cases}$$

On peut négliger la composante du champ selon  $\vec{u}^{\perp}$  si  $\frac{I_{out}^{\perp}}{I_{out}^{\parallel}} \sin(\nabla OPD_{out}^{\parallel} - \nabla OPD_{out}^{\perp}) \ll \nabla OPD_{out}^{\parallel}$ .

Dans le cas où  $\Delta\delta$  est petit,

$$\begin{cases} I^{\parallel} = 1 - I^{\perp} = 1 \\ I^{\perp} = \frac{k^2\Delta\delta^2}{4} \sin^2 2(\theta - \theta_0) \end{cases}$$

et on peut écrire :

$$\frac{k^2\Delta\delta^3}{8} \ll \nabla OPD^{\parallel} \quad (3.65)$$

et

$$\frac{k^2\Delta\delta^2}{2L_B} \ll \frac{\bar{\delta}}{L_{OPD}} \quad (3.66)$$

avec  $\bar{\delta}$  la valeur moyenne de l'OPD,  $L_B$  et  $L_{OPD}$  respectivement les longueurs typiques de biréfringence et d'OPD qui représentent la taille typique des structures biréfringentes et des objets de phase. En faisant l'hypothèse que  $L_{OPD} \approx L_B$  Finalement, on obtient l'expression suivante :

$$\left(\frac{\Delta\delta}{\bar{\delta}}\right)^3 \ll \frac{8}{k^2 \bar{\delta}^2} \quad (3.67)$$

$$\left(\frac{\Delta\delta}{\bar{\delta}}\right) \ll \sqrt[3]{\frac{2\lambda^2}{\pi^2 \bar{\delta}^2}} \quad (3.68)$$

$$\text{Or, } \frac{\Delta\delta}{\bar{\delta}} = \frac{\Delta n \times e}{n \times e} = \frac{\Delta n}{n}$$

$$\frac{\Delta n}{n} \ll \sqrt[3]{\frac{2}{\pi^2}} \left(\frac{\lambda}{\bar{\delta}}\right)^{2/3} \quad (3.69)$$

On peut faire une application numérique avec  $\bar{\delta}=10 \mu\text{m}$ ,  $\lambda=0,7\mu\text{m}$ . On trouve

$$\left(\frac{\lambda}{\bar{\delta}}\right)^{2/3} \ll 0,2 \quad (3.70)$$

Cette valeur est tout à fait en accord avec les valeurs attendues autour de  $10^{-2}$ - $10^{-3}$  et 1,3-1,5 pour  $\Delta n$  et  $n$  respectivement dans des milieux biologiques. Pour des objets moins déphasants, le rapport est majoré par un nombre supérieur à 0,2. En conclusion, cette inégalité est toujours vraie dans le cas d'échantillons biologiques.

### 3.3.2.5 Domaine de validité pour lequel la composante orthogonale est négligeable. Confirmation par des simulations

Afin d'évaluer la validité de l'hypothèse réalisée sur le fait de négliger  $E_{out}^{\vec{1}}$  précédemment dans la partie 3.3.2.1 et évaluer l'erreur qui est réalisée sur la mesure de retard, un algorithme a été implémenté. Le but de cet algorithme est de simuler un objet biréfringent, de créer les interférogrammes et de les analyser de la même façon que pour des images expérimentales.

L'épaisseur  $e$  de l'objet est variable spatialement afin de simuler des retards différents  $e = e_0 \cdot e^{-x^2/a^2}$ , avec  $a$  permettant de modifier la taille de l'objet et par conséquent son échantillonnage sur l'image d'OPD finale.

La biréfringence de l'objet vaut  $\Delta n = 10^{-2}$  avec un indice de réfraction du milieu équivalent à celui de l'eau ( $n_{milieu} = 1,33$ ). On utilise des indices de réfraction proches de ceux trouvés dans la littérature concernant les milieux biologiques (indices variant de 1,3 à 1,5).

A partir de cet objet et de l'équation du champ (3.48), on génère différents interférogrammes [41] suivant des polarisations parallèles et perpendiculaire en tenant compte d'un angle de polarisation incident pour l'illumination. Pour un angle d'illumination donné, l'indice  $n(\theta)$  et par conséquent l'OPD de l'objet extrait après traitement des interférogrammes seront différents.

En utilisant plusieurs orientations, on génère ainsi un ensemble d'interférogrammes. On peut déterminer après extraction pixel par pixel de l'OPD et ajustement, comme c'est le cas pour les courbes expérimentales, le retard de l'objet et son orientation. On présentera la méthode d'extraction de  $\Delta\delta$  et de  $\theta$  plus tard au sein de cette partie.

Du bruit de type gaussien est ajouté aux images afin d'être pris en compte dans les résultats de cette simulation. Afin de se rapprocher des conditions de l'expérience, la valeur de bruit considérée a été mesurée expérimentalement en évaluant l'écart type d'images de

retard. Les résultats sont présentés dans la partie 3.4.

Ce processus est répété pour plusieurs valeurs de retard  $\Delta\delta$  allant de 0 à 3  $\mu\text{m}$ . Pour les échantillons biologiques, les valeurs de retard dans le cadre de nos applications d'imagerie de biréfringence de fibres varient typiquement de 10 à 200 nm.

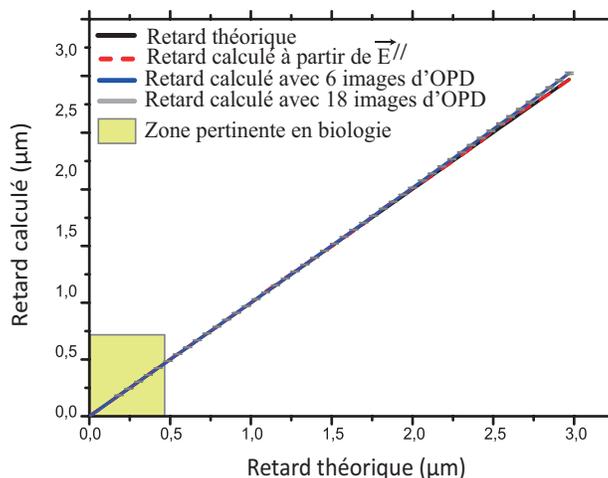


FIGURE 3.6 – Résultats de mesure de retard calculée pour des valeurs simulées allant de 0 à 3  $\mu\text{m}$  en utilisant  $N=6$  et  $N=18$  angles de polarisation pour construire le set d'images d'OPD.

Le retard calculé et le retard théorique en fonction du retard théorique sont représentés Figure 3.6 afin de visualiser les comportements des courbes et l'écart des valeurs mesurées aux valeurs théoriques. De 0 à 3  $\mu\text{m}$ , les courbes "théorique" et celle calculée à partir du champ  $E_{out}^{\parallel}$  seul sont parfaitement confondues avec 0,15% d'erreur relative en moyenne.

Jusqu'à 1  $\mu\text{m}$  de retard, les courbes "théorique" et calculées à partir du champ total ( $E_{out}^{\parallel} + E_{out}^{\perp}$ ) avec un stack composé de 6 ou 18 images d'OPD se superposent parfaitement. A partir de 1  $\mu\text{m}$  et jusqu'à 3  $\mu\text{m}$ , l'écart de cette courbe à la courbe théorique augmente jusqu'à atteindre 0,1% à 3  $\mu\text{m}$ .

Le nombre de points utilisé pour échantillonner la sinusoïde ne semble pas avoir d'influence sur la mesure du retard. En effet, l'utilisation de 6 ou 18 points donne les mêmes résultats et les courbes sont confondues, le bruit n'introduit donc pas d'erreur systématique.

L'erreur absolue commise pour la mesure de retard de 0 à 3  $\mu\text{m}$  avec 6 et 18 points est représentée en Figure 3.7. Les deux courbes sont confondues comme précédemment et une seule des deux courbes a été représentée sur la figure. On constate que pour un retard mesuré de 3  $\mu\text{m}$ , l'erreur absolue est de 0,06  $\mu\text{m}$ , ce qui représente 2% d'erreur en relatif. Pour des retards plus faibles (inférieurs à 1  $\mu\text{m}$ ), comme ceux auxquels on s'intéresse dans

le cadre d'échantillons biologiques, l'erreur absolue est très faible et typiquement inférieure à 3 nm, ce qui qualifie la justesse de la mesure de retard. On verra par la suite que dans le cas d'échantillons biologiques, les valeurs typiques de retard sont de l'ordre de quelques nm, le biais dans ce cas est très faible et inférieur à  $10^{-5}$   $\mu\text{m}$ .

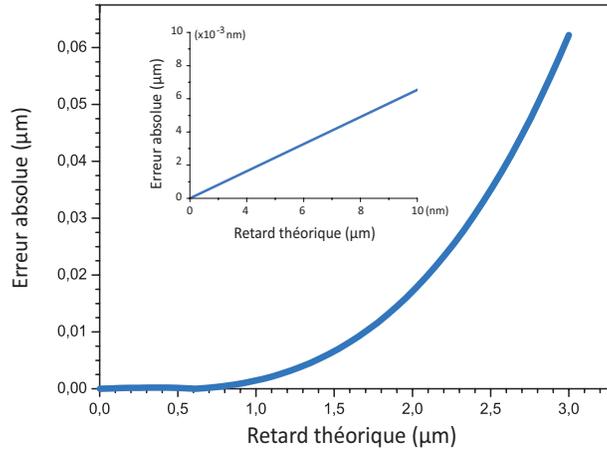


FIGURE 3.7 – Erreur absolue réalisée sur la mesure de retard pour des valeurs simulées allant de 0 à 3  $\mu\text{m}$  en utilisant  $N=6$  et  $N=18$  angles de polarisation pour construire le set d'images d'OPD.

La Figure 3.8 représente l'erreur absolue en degrés sur la détermination de  $\theta_0$ . Le nombre de points pour échantillonner la sinusoïde ne paraît pas avoir d'influence sur la valeur calculée de retard mais sur la détermination de l'orientation (i.e. détermination de  $\theta_0$ ). Jusqu'à 3  $\mu\text{m}$ , l'erreur est inférieure au dixième de degré. Pour des valeurs de retard élevées, on remarque que cette erreur est due à la forme de la courbe qui se trouve être de moins en moins sinusoïdale à mesure que le retard augmente (voir figure 3.9). On attribue cette déformation au fait que la contribution du champ  $E_{out}^{\perp}$  devient plus importante pour des valeurs de retard élevées.

Grâce à ces résultats, on valide la méthode de mesure. La conclusion de cette étude est que l'on peut négliger le phénomène de cross-talk (i.e. le transfert d'une polarisation à une polarisation orthogonale) ce qui nous permet de réaliser la mesure uniquement avec un système ne comportant qu'un seul polariseur en amont en l'échantillon. La mesure est valable pour des valeurs de retard de biréfringence allant jusqu'à 3  $\mu\text{m}$  avec moins de 60 nm d'erreur absolue sur une mesure de retard de 3  $\mu\text{m}$  et moins d'un degré d'erreur sur la détermination de  $\theta_0$ .

Pour des valeurs typiques de biréfringence d'échantillons biologiques de l'ordre de la dizaine de nm, l'erreur réalisée est très inférieure au bruit de mesure. On peut ainsi réaliser une mesure de retard sans détection polarisée en supposant des valeurs typiques de biréfringence et des échantillons relativement fins (le retard doit être typiquement inférieur à 3  $\mu\text{m}$ ) pour extraire des informations de retard et d'orientation de notre échantillon.

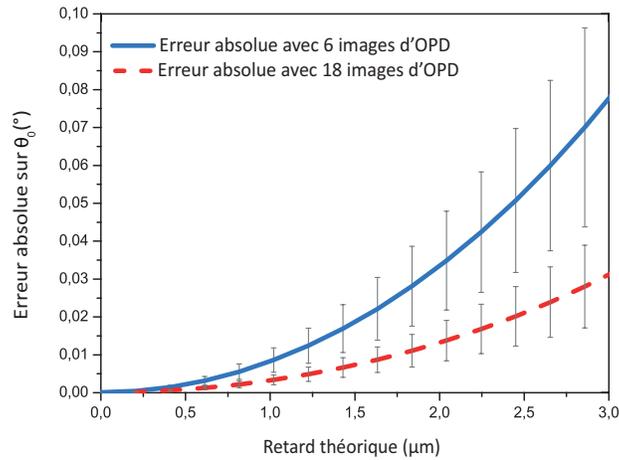


FIGURE 3.8 – Erreur absolue réalisée sur la mesure d'angle  $\Theta_0$  pour des valeurs de retard allant de 0 à 10  $\mu\text{m}$  en utilisant  $N=6$  et  $N=18$  angles de polarisation pour construire le set d'images d'OPD.

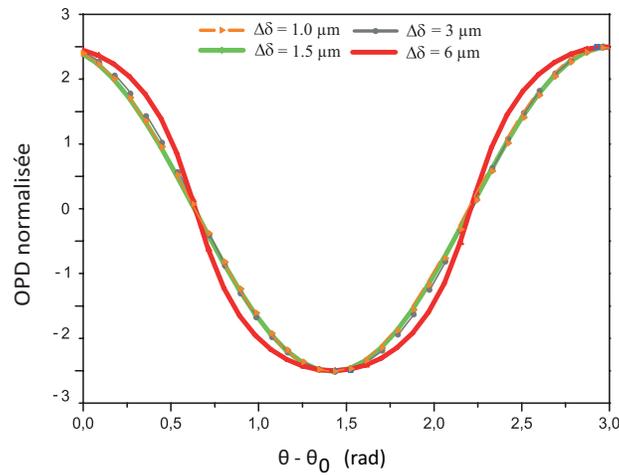


FIGURE 3.9 – OPD Normalisé en fonction de l'angle pour différentes valeurs de retard.

Cette technique est ainsi applicable à des mesures sur des fibres au sein d'échantillons biologiques mais également sur des échantillons plus épais comme les minéraux comme nous le verrons dans la partie résultats.

### 3.3.3 Détermination expérimentale de $\Delta\delta$ , $\frac{(\delta_o + \delta_e)}{2}$ et $\theta_0$

#### 3.3.3.1 Calcul des coefficients de biréfringence

On a montré que la composante selon  $u^\perp$  du champ est négligeable (équation (3.63)), on peut envisager un montage sans analyseur après l'échantillon. Il est utile pour diminuer le bruit expérimental de réaliser un ajustement des points expérimentaux. On utilise pour cela une fonction sinusoïdale d'équation :

$$OPD(\theta_j) = A + B \cos(2\theta_j) + C \sin(2\theta_j) \quad (3.71)$$

avec  $A = \frac{(\delta_o + \delta_e)}{2}$ ,  $B = \frac{\Delta\delta}{2} \cos(2\theta_0)$  et  $C = \frac{\Delta\delta}{2} \sin(2\theta_0)$ .

Pour résoudre le système et déterminer les coefficients A, B et C qui nous intéressent, on effectue une régression linéaire de l'OPD grâce à la méthode des moindres carrés.

Ainsi, à partir de ce fit, on est en mesure d'extraire trois paramètres :  $\Delta\delta$ ,  $\frac{(\delta_o + \delta_e)}{2}$  et  $\theta_0$  avec le calcul des incertitudes correspondantes.

On donne les expressions de  $\theta_0$  et  $\Delta\delta$  :  $\theta_0 = \arctan(C/B)$  et  $\Delta\delta = 2\sqrt{C^2 + B^2}$ .

On voit que les variables B et C sont corrélées, on utilise la relation suivante impliquant les dérivées partielles de  $\theta_0$  suivant B et C ainsi que les variances des coefficients.

D'une façon générale, pour une fonction  $f$  dépendant de deux variables  $x_1$  et  $x_2$ , on peut écrire :

$$\begin{cases} dy = \left(\frac{\partial f}{\partial x_1}\right)dx_1 + \left(\frac{\partial f}{\partial x_2}\right)dx_2 \\ dy^2 = \left(\frac{\partial f}{\partial x_1}\right)^2(dx_1)^2 + \left(\frac{\partial f}{\partial x_2}\right)^2(dx_2)^2 + 2\left(\frac{\partial f}{\partial x_1}\right)\left(\frac{\partial f}{\partial x_2}\right)dx_1dx_2 \\ \sigma_y^2 = \left(\frac{\partial f}{\partial x_1}\right)^2(\sigma_{x_1})^2 + \left(\frac{\partial f}{\partial x_2}\right)^2(\sigma_{x_2})^2 + 2\left(\frac{\partial f}{\partial x_1}\right)\left(\frac{\partial f}{\partial x_2}\right)\sigma_{x_1}\sigma_{x_2} \end{cases}$$

On applique ce raisonnement à nos grandeurs d'intérêt.

Détermination de l'incertitude sur  $\Delta\delta$  :

$$\sigma_{\Delta\delta}^2 = \left(\frac{\partial\Delta\delta}{\partial B}\right)^2(\sigma_B)^2 + \left(\frac{\partial\Delta\delta}{\partial C}\right)^2(\sigma_C)^2 + 2\left(\frac{\partial\Delta\delta}{\partial B}\right)\left(\frac{\partial\Delta\delta}{\partial C}\right)\sigma_B\sigma_C \quad (3.72)$$

$$\sigma_{\Delta\delta}^2 = \left(\frac{2B}{\sqrt{B^2 + C^2}}\right)(\sigma_B)^2 + \left(\frac{2C}{\sqrt{B^2 + C^2}}\right)(\sigma_C)^2 - \left(\frac{4BC}{B^2 + C^2}\right)\sigma_B\sigma_C \quad (3.73)$$

Détermination de l'incertitude sur  $\theta_0$  :

$$\sigma_{\theta_0}^2 = \left(\frac{\partial\theta_0}{\partial B}\right)^2(\sigma_B)^2 + \left(\frac{\partial\theta_0}{\partial C}\right)^2(\sigma_C)^2 + 2\left(\frac{\partial\theta_0}{\partial B}\right)\left(\frac{\partial\theta_0}{\partial C}\right)\sigma_B\sigma_C \quad (3.74)$$

$$\sigma_{\theta_0}^2 = \left(\frac{B}{B^2 + C^2}\right)(\sigma_B)^2 - \left(\frac{C}{\sqrt{B^2 + C^2}}\right)(\sigma_C)^2 - \left(\frac{BC}{(B^2 + C^2)^2}\right)\sigma_B\sigma_C \quad (3.75)$$

On peut utiliser un nombre  $N$  différent d'angles de polarisation pour échantillonner la sinusoïde. Dans le cadre d'une technique qui se veut rapide, on cherche à réaliser la mesure en un minimum de temps, c'est-à-dire en utilisant un nombre limité d'angles de polarisation.

Pour ajuster une courbe sinusoïdale, on sait que seulement trois points sont nécessaires mais si l'on veut le faire de façon rigoureuse et diminuer les erreurs, alors il faut utiliser plus de points. Cette hypothèse suppose que les mesures sont effectuées sur un signal stable dans le temps. Si ce n'est pas le cas, alors multiplier le nombre de mesures et donc le temps d'acquisitions introduira plus de bruit, c'est ce que l'on verra par la suite.

Dans notre cas, on utilisera  $N=6$  au minimum entre  $0$  et  $\pi$  pour déduire les différents coefficients et leurs incertitudes qui nous seront utiles pour discriminer ensuite le signal du bruit de mesure.

### 3.3.3.2 Choix de la répartition des angles d'excitation

On réalise une étude sur le choix des points expérimentaux et l'effet de leur répartition pour échantillonner la sinusoïde.

Les résultats sont présentés dans le Tableau 3.1. On simule des valeurs d'OPD obtenues pour  $N=6$  pour un objet biréfringent tel que  $\Delta\delta=22$  nm et  $\theta_0=1$  rad. Les points obtenus sont ajustés grâce au fit utilisé pour ajuster les données expérimentales (voir équation (3.71)) et l'incertitude sur la détermination de  $\Delta\delta$  et  $\theta_0$  est calculée. Cette simulation a été effectuée pour 5 cas différents où le nombre de points et la répartition de ces derniers varie avec un nombre d'essais égal à 100.

On constate que pour minimiser l'erreur sur la détermination des paramètres, la répartition doit être homogène et uniforme entre  $0$  et  $\pi$ . En effet, à nombre de points égal, l'incertitude est plus faible pour une répartition homogène et étendue (cas 4). De plus, en utilisant 18 points au lieu de 6 (cas 5), on peut réduire l'incertitude sur la détermination du paramètres  $\Delta\delta$  de 0,57 nm à 0,33 nm pour une valeur de retard de 22 nm. Néanmoins, on considérera que cette erreur est acceptable pour 6 points et que le gain de temps est plus important dans le cadre de nos expériences. On résume le principe de la mesure effectuée : pour chaque angle direction de polarisation incidente envoyée sur l'échantillon, une image d'OPD est enregistrée. On obtient de cette façon ce que l'on appelle un ensemble de polarisations.

Les images sont ensuite traitées pixel par pixel. Pour chaque pixel, on a autant de points de mesure que d'angles de polarisation choisis. La courbe est ajustée à l'aide de l'équation (3.71). Ainsi, pour chaque pixel, on a l'information locale de retard et d'orientation (voir Figure 3.10).

Cas	Nombre de points	Étendue (rad)	Incrément (rad)	$\Delta\delta$ (nm)	$\theta_0$ (rad)
1	6	$0-0,27\pi$	0,17	$22,3 \pm 2,8$	$1,1 \pm 0,05$
2	6	$0,70\pi-0,97\pi$	0,17	$22,5 \pm 1,7$	$1,1 \pm 0,1$
3	6	$0,38\pi-0,65\pi$	0,17	$22,6 \pm 1,7$	$1,1 \pm 0,1$
4	6	$0-0,81\pi$	0,51	$22,4 \pm 0,6$	$1,1 \pm 0,03$
5	18	$0-0,92\pi$	0,17	$22,3 \pm 0,3$	$1,1 \pm 0,01$

Tableau 3.1 – Étude de l'effet du choix des angles de polarisation et de leur répartition au niveau de la sinusoïde pour la réalisation du fit. Simulation réalisée pour des valeurs  $\Delta\delta=22$  nm et  $\theta_0=1$  rad.

### 3.3.3.3 Visualisation des paramètres de biréfringence

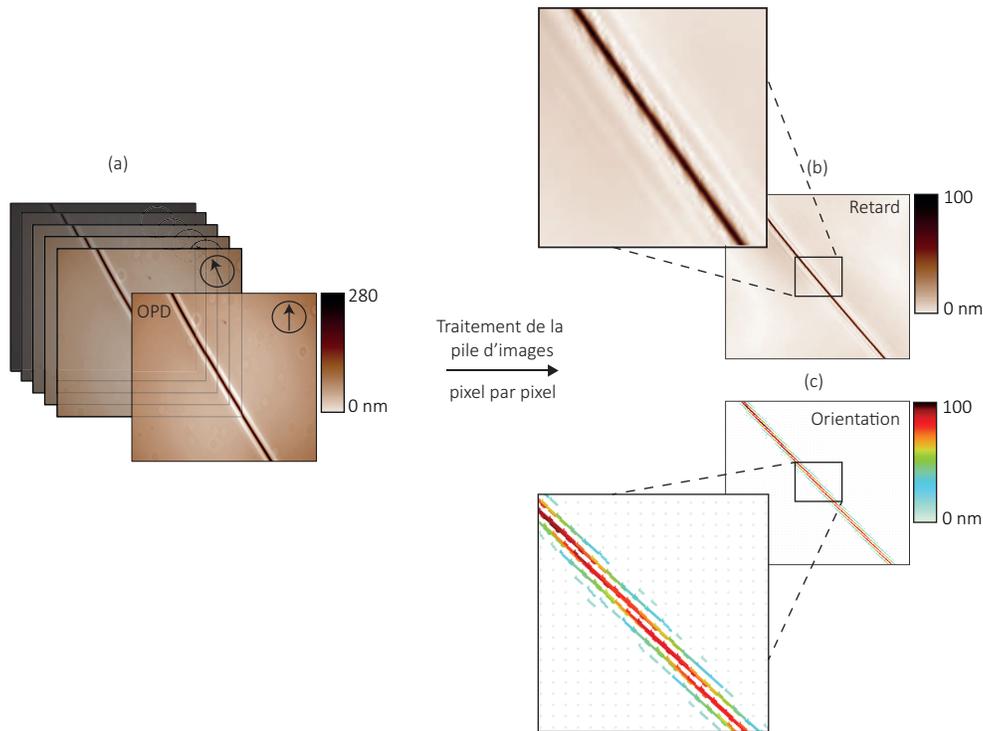


FIGURE 3.10 – Principe du traitement du stack d'images d'OPD polarisées (a) afin de créer numériquement deux images dont le contraste dépend du retard  $\Delta\delta$  (b) et de l'orientation locale  $\theta_0$ (c).

L'image dont le contraste dépend du retard révèle les composants anisotropes de l'image (voir Figure 3.10(b)). Plus le retard de l'élément est grand et plus il apparaît contrasté sur l'image. La seconde image créée est une image qui donne l'orientation de l'élément biréfrin-

gent (voir Figure 3.10(c)). L'orientation de l'axe optique de l'élément est représentée par un trait dont la direction donne l'angle  $\theta_0$  respectivement au repère du laboratoire. La longueur du trait est proportionnelle à la valeur de retard du pixel correspondant. Un codage en fausses couleurs est également utilisé pour une meilleure visualisation de l'information.

## 3.4 Validation expérimentale

### 3.4.1 Montage expérimental

Le montage expérimental pour réaliser des mesures de retard est quasiment identique à celui utilisé pour l'imagerie de phase classique avec notre analyseur de front d'onde, la différence résidant seulement dans le fait qu'on utilise une illumination dont la polarisation varie pour éclairer l'échantillon.

Comme dans la partie 2.2.1, on utilise une illumination cohérente spatialement avec un diaphragme d'ouverture fermé à son maximum. Il est important que l'illumination soit cohérente spatialement afin de considérer que l'onde qui se propage suivant l'axe optique du système est plane et est orthogonale au plan (XY) défini par l'échantillon.

Un autre point important est que l'onde soit polarisée linéairement de manière homogène sur tout le champ. Pour cela, le polariseur doit être placé au niveau du diaphragme de champ de façon à ce qu'il soit conjugué avec le plan de l'échantillon.

Le montage expérimental est illustré Figure 3.11. Il est composé d'un microscope inversé conventionnel (TE2000-U, Nikon, Japan). On ajoute un filtre passe bande  $750 \pm 30$  nm afin d'éviter le phénomène de dispersion de l'indice de réfraction. On travaille également dans le proche infrarouge qui est faiblement absorbé par les cellules, ce qui limite la phototoxicité et permet de réaliser des expériences longues sur cellules sans les endommager.

Pour réaliser les différentes expériences présentées dans la section résultats (partie 3.5), on utilise différents objectifs Nikon de grandissement  $40\times$  et d'ouverture numérique 0,75 et de grandissement  $100\times$ , ON=1,3. Deux lentilles de tube de 300 et 400 mm de focale seront utilisées pour réaliser un grandissement supplémentaire de 1,5 et  $2\times$  afin d'échantillonner correctement le signal sur le détecteur.

L'élément polarisant utilisé est un polariseur inséré dans une platine de rotation (NewStep NSR Series Universal Rotator, Newport, US). Il est placé au niveau de l'illumination avant le condenseur. Le choix s'est porté sur ce composant en raison de sa simplicité d'utilisation et d'interfaçage. Il est cependant lent et on verra qu'un certain nombre d'artéfacts dans les images peuvent lui être imputés.

---

0. Pour les objectifs Nikon, le grandissement est donné pour une lentille de tube de focale 200 mm.

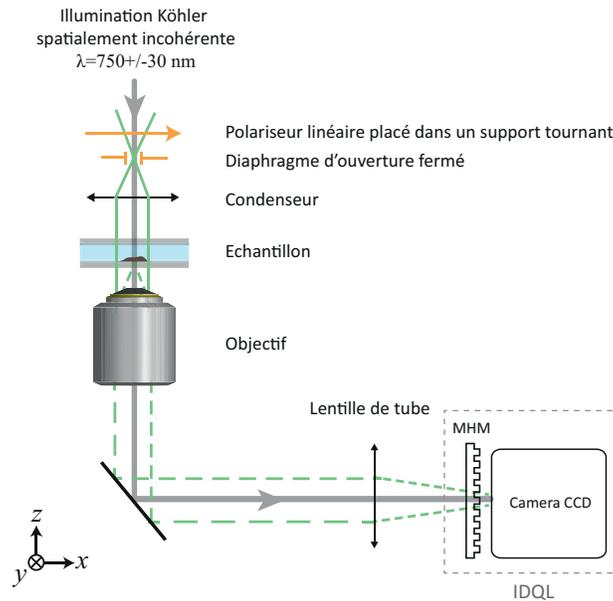


FIGURE 3.11 – Schéma du montage expérimental dédié à l'imagerie de retard.

### 3.4.2 Erreurs commises sur la mesure de retard

Dans cette partie, on décrira les différentes étapes de la mesure menant à l'extraction de la valeur de retard en minimisant les différentes sources d'erreurs expérimentales. On peut identifier différentes sources d'erreur pouvant affecter la mesure et les incertitudes associées.

#### 3.4.2.1 Moyenne d'acquisitions

La première source vient directement de la mesure d'OPD (*i.e.* de l'acquisition fondamentale d'interférogrammes *image* et *référence* pour chaque illumination).

On a vu dans la partie 2.2.2, que l'écart type standard de l'OPD était plus faible dans le cas d'acquisitions moyennées. Dans ce but, chaque image d'OPD résulte de l'association d'interférogrammes *images* moyennés 5 fois et d'interférogrammes *référence* moyennés 30 fois. Dans ces conditions, grâce à la courbe donnant l'écart type en nm de la valeur d'OPD, on peut définir l'écart type des mesures réalisées :  $\sigma(\text{OPD}) = 0,25 \text{ nm}$ .

L'écart type temporel en chaque pixel d'une série d'images moyennées a également été calculé. Il est de 0,19 nm pour 5 images et de 0,09 nm pour 30 images.

Dans le cadre de notre expérience, c'est l'écart type spatial qui limitera la mesure.

#### 3.4.2.2 Prise de référence

On a expliqué précédemment (chapitre 1.2.4.5) qu'il était nécessaire de prendre une référence avant de pouvoir réaliser une image de phase quantitative afin de s'affranchir des

aberrations du système optique du microscope.

Il s'agit de voir s'il est nécessaire de prendre une image de référence pour chaque angle de polarisation ou si une seule référence peut suffire à l'analyse des interférogrammes acquis. On étudie pour une zone d'une lamelle l'effet de l'association de différents interférogrammes acquis pour 3 angles de polarisation différents (0, 60 et 90°) avec une référence prise à 0°. Le but est de voir si la mesure d'un champ vide varie quand la polarisation change. Les résultats sont présentés dans la Figure 3.12. La distribution des valeurs des pixels des 3 différentes images d'OPD est représentée à l'aide d'un histogramme et l'écart type des 3 images correspondantes est calculé. Avec l'association correcte interférogramme *image* et *référence* pris pour le même angle de polarisation, l'écart type est de 0,62 nm. Avec les 2 autres associations d'interférogrammes, l'écart type vaut 0,85 (interférogramme *image* pris à 60° et interférogramme *référence* pris à 0°) et 1,05 nm (interférogramme *image* pris à 90° et interférogramme *référence* pris à 0°).

La conclusion de cette étude est que la composante statique du chemin optique varie avec la polarisation. Je suppose que cela est dû aux contraintes mécaniques de l'objectif de microscope. En effet, on remarque des variations de faibles fréquences spatiales sur les images d'OPD de la Figure 3.12 que l'on attribue à la biréfringence de l'objectif utilisé. Il est donc nécessaire de prendre un stack d'interférogrammes de référence pour chacun des angles de polarisation considéré.

Dans le cas de cette application où l'illumination est sélectivement modifiée, un stack d'interférogrammes de *référence* doit être enregistré au niveau d'une zone vide de l'échantillon au même titre que le stack d'interférogrammes *images* réalisé sur la zone d'intérêt de l'échantillon. Ces références prises pour chacun des angles de polarisation choisis permettent de s'affranchir de la composante statique de la différence de chemin optique qui se révèle être dépendante de la polarisation.

Le processus d'acquisition est ainsi composé de deux étapes : une référence est prise pour chaque angle de polarisation choisi dans une zone vide de l'échantillon, ensuite on réalise l'acquisition dans une zone choisie de l'échantillon. Les interférogrammes *image* sont associés chacun avec l'interférogramme *référence* correspondant afin de réaliser les différentes images d'OPD.

Dans la suite, il sera implicite que pour chaque expérience, une référence sera acquise pour chaque polarisation.

On peut noter qu'un seul stack d'interférogrammes de référence peut être pris au cours d'une même expérience pour être associé avec les différents interférogrammes acquis par la suite si les conditions expérimentales restent inchangées (type de support, grandissement, éclairage, etc...).

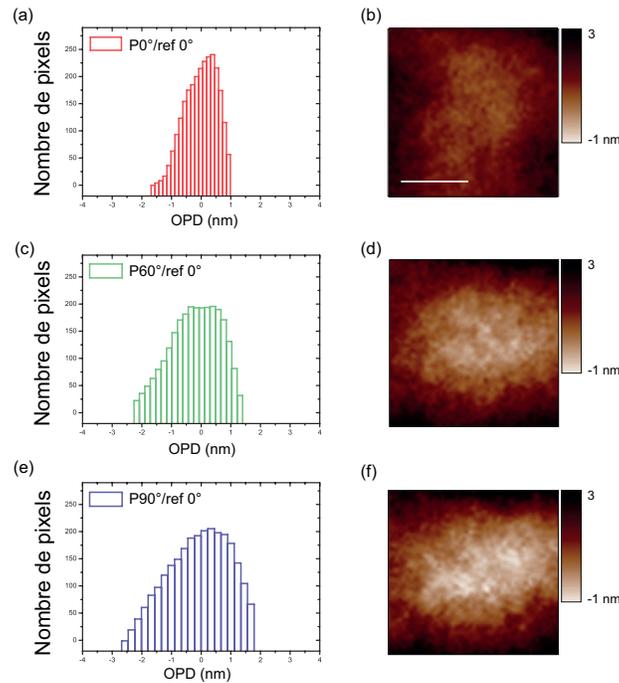


FIGURE 3.12 – (a, c et e) Représentation de la distribution de la valeur d’OPD de zones vides de l’échantillon résultant de l’association d’images prises à des angles de polarisation différents (0, 60 et 90°) et d’une référence prise à un 0°. L’échelle sur la figure (b) représente 6  $\mu\text{m}$ . Observation réalisée avec un grandissement total de 80 $\times$  avec un objectif d’ouverture numérique égale à 1,3.)

### 3.4.2.3 Erreur sur la polarisation incidente

Une autre source d’erreur peut venir d’une différence de re-positionnement du polariseur. On a dit précédemment qu’un stack de référence devait être enregistré avant de réaliser les mesures. Si le positionnement entre l’acquisition des références et des images n’est pas le même, alors on peut avoir un biais de mesure et des incertitudes. Les données constructeur spécifient une répétabilité unidirectionnelle de 0,25 degrés. La répétabilité de la mesure d’anisotropie est égale à la répétabilité de la mesure d’OPD mesurée à laquelle il faut ajouter l’erreur de re-positionnement du polariseur.

### 3.4.2.4 Erreur due au mouvement de l’échantillon

La dernière source d’erreur, qui est probablement la plus importante et la plus difficile à contourner, est liée au fait que l’échantillon est dynamique. Si des modifications à l’échelle du pixel s’opèrent, alors cela peut être interprété à tort comme un signal d’anisotropie. La rotation de polarisation étant mécanique, 10 secondes sont nécessaires en général pour

obtenir la pile d'images de polarisation.

L'idée est de minimiser la durée d'acquisition au maximum afin de réduire autant que possible cette source d'erreur. Nous verrons plus tard comment cela peut être réalisé techniquement en modifiant le système de polarisation de l'illumination.

## 3.5 Résultats

Dans la suite, il sera implicite qu'un set d'images de références sera pris en début d'expérience pour être associé aux interférogrammes *images* afin de pouvoir extraire uniquement l'information de retard apporté par l'échantillon. Aussi, chacun des interférogrammes *image* sera moyenné 5 fois et chaque interférogramme *référence* sera moyenné 30 fois.

En fonction de l'échantillon, on utilisera 6 ou 18 points pour échantillonner la sinusoïde. Les angles seront pris entre 0 et  $\pi$  et équidistants puisque l'on a vu avec une étude précédente (partie 3.3.3.2) que la répartition des points pouvait avoir une influence sur le résultat du fit.

### 3.5.1 Échantillons de référence

Comme c'est généralement le cas en métrologie, des échantillons "connus" sont utilisés dans un premier temps en vue d'une caractérisation des capacités de la mesure.

#### 3.5.1.1 Cas d'un échantillon isotrope (blanc métrologique)

On image un échantillon constitué de fibres de verre dans un milieu d'immersion aqueux. Le verre est un matériau isotrope, c'est à dire qu'il n'y a pas de direction privilégiée au sein de ce matériau et que l'indice de réfraction est indépendant de la polarisation de la lumière incidente.

Le verre étant isotrope, on ne devrait avoir de signal que sur les images d'OPD et d'OPD moyen et aucun contraste sur les images de biréfringence. Au niveau de l'image de retard et l'orientation, on ne doit avoir aucun signal interprétable comme de la biréfringence et l'orientation locale doit être aléatoire pour chaque pixel.

Les résultats de l'expérience sont présentés en Figure 3.13.

Sur l'image d'OPD, la fibre apparaît en contraste négatif car l'indice de la fibre est plus petit que celui du milieu environnant. Sur l'image de biréfringence, on voit que l'on a essentiellement du bruit avec un motif aléatoire de la valeur d'OPD des pixels de l'image. On peut calculer un écart type spatial  $\sigma$  des pixels de l'image de biréfringence en comparant deux zones : une zone correspondant à une zone vide de l'échantillon et une zone où se trouve la fibre de verre. On trouve des valeurs respectives similaires de 0,58 nm et 0,57 nm.

L'écart type des pixels est de l'ordre de grandeur du bruit calculé dans la partie caractérisation de la méthode 2.2.2, on peut donc affirmer que le signal correspond à un bruit de

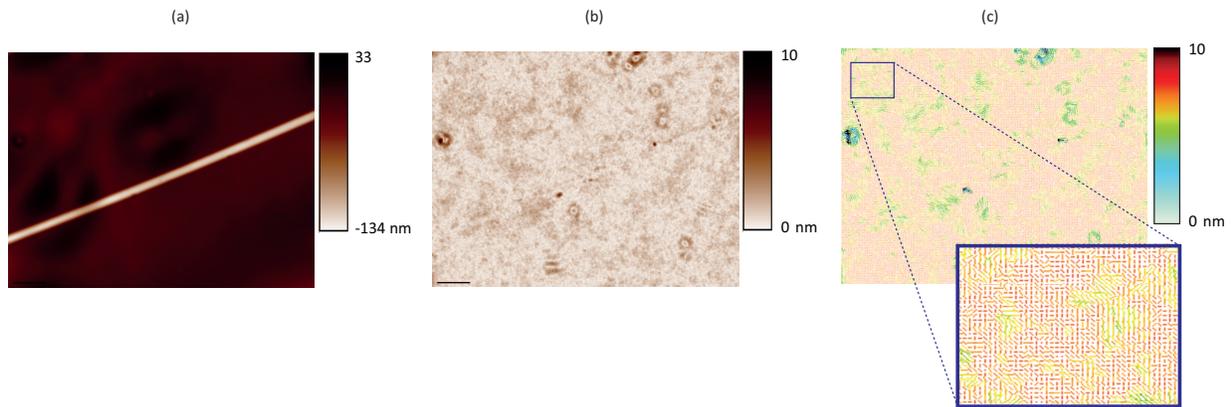


FIGURE 3.13 – . Imagerie d’une fibre de verre de diamètre environ  $10\ \mu\text{m}$  placée dans un milieu d’immersion aqueux d’indice déterminé grâce à un réfractomètre d’Abbe. (a) Image d’OPD, (b) image de retard  $\Delta\delta$  et (c) image d’orientation de la région délimitée par le carré vert sur l’image (b). Observation avec un objectif à immersion de grandissement de  $60\times$  avec  $\text{ON}=0,6$ . L’échelle représente  $20\ \mu\text{m}$  sur l’image.

mesure et non à du signal utile. Ceci nous permet de mesurer la résolution en retard de nos images. En effet, on sera en mesure de mesurer un retard uniquement si la valeur de signal est plus grande que  $0,58\ \text{nm}$  étant donné 5 images moyennées par position de polariseur. On peut également visualiser l’orientation locale d’une zone de l’image de retard afin de constater que l’orientation des pixels de l’image est aléatoire (voir Figure 3.13(c)).

En conclusion, on peut affirmer que seuls les éléments anisotropes de l’échantillon apparaîtront sur l’image de retard. En première approximation, on peut discriminer les structures anisotropes des structures isotropes dès que la valeur de  $\Delta\delta$  dépasse la limite de détection qui vaut  $2\sigma$  soit  $1,16\ \text{nm}$ .

On utilise cet échantillon pour mesurer la répétabilité de la mesure. Successivement, 3 sets d’images de polarisation avec 6 points sont enregistrés et analysés sur une même zone de l’échantillon. On calcule ensuite l’écart type de la valeur de biréfringence en chaque pixel (sur 3 mesures). La valeur moyenne des écart-types calculée est de  $0,5\ \text{nm}$ .

### 3.5.1.2 Étude de cristaux

Les cristaux sont connus pour leurs propriétés d’anisotropie résultant de leur nature cristalline. Dans un cristal, les atomes sont arrangés d’une façon régulière et périodique, la formation de la maille et la constitution des nœuds qui leur confèrent des propriétés d’anisotropie. On se propose d’étudier des cristaux de quartz (milieu biréfringent uniaxe) afin de réaliser une mesure de biréfringence sur un échantillon tabulé. En effet, la biréfringence du quartz est connue et évaluée à  $\Delta n = 0,0091$  à  $\lambda=700\ \text{nm}$  avec  $n_o=1,5442$  et  $n_e=1,5533$  [85].

On sait qu’avec notre mesure, l’épaisseur et l’indice de réfraction sont corrélés (voir

équation (2.1)).

Du fait de la géométrie des cristaux (la topographie du cristal variant beaucoup), il n'est pas possible d'avoir une information sur leur épaisseur locale et d'en déduire une valeur de biréfringence. L'idée pour réaliser la mesure serait de s'affranchir de l'épaisseur. Couramment, la solution est de réaliser deux échantillons avec deux milieux d'immersion différents.

On va mesurer la valeur de  $\frac{2\Delta\delta}{\delta_e + \delta_o}$  pour différentes épaisseurs de cristal à priori inconnues.

Traçons  $2\Delta\delta$  en fonction de  $(\delta_e + \delta_o)$ . La pente  $p$  vaut  $2(n_e - n_o)$ . Une régression linéaire est effectuée sur les points. Pour un milieu donné, on obtient l'équation suivante à deux inconnues  $n_o$  et  $n_e$  :

$$\frac{2\Delta\delta}{\delta_e + \delta_o} = \frac{2(n_e - n_o)}{n_e + n_o - 2n_{\text{milieu}}} = p \quad (3.76)$$

Avec  $p$ , le coefficient directeur de la droite obtenue.

En utilisant un second échantillon avec un autre milieu d'immersion, on obtient une seconde équation qui va nous permettre de déterminer les indices  $n_o$  et  $n_e$ .

On choisit d'utiliser un milieu aqueux (Cargille, Cedar Grove, USA) dont l'indice de réfraction est connu à  $\lambda=700$  nm et vaut :  $n=1,5131$ . Le second milieu d'immersion utilisé est une solution de glycérol pur d'indice de réfraction valant  $n=1,4687$  à  $\lambda=700$  nm [110].

En utilisant les notations  $n_{\text{milieu 1}}$  et  $p_1$  pour le premier milieu et  $n_{\text{milieu 2}}$  et  $p_2$  pour le second milieu d'immersion, on écrit :

$$\begin{cases} p_1 = \frac{n_e - n_o}{n_e + n_o - 2n_{\text{milieu 1}}} \\ p_2 = \frac{n_e - n_o}{n_e + n_o - 2n_{\text{milieu 2}}} \end{cases} \quad (3.77)$$

$$\begin{cases} n_o = \frac{p_2 n_{\text{milieu 2}}(p_1 - 2) + p_1 n_{\text{milieu 1}}(2 - p_2)}{2(p_1 - p_2)} \\ n_e = \frac{n_o(p_1 + 2) - 2p_1 n_{\text{milieu 1}}}{2 - p_1} \end{cases} \quad (3.78)$$

Les résultats sont présentés en Figure 3.14. Chaque point de la courbe représente la valeur locale de  $\Delta\delta$  et de  $(\delta_e + \delta_o)/2$  en chacun des pixels considérés. On voit clairement que l'on peut définir des zones différentes pour les deux milieux d'immersion différents au sein de cet espace  $\Delta\delta$  en fonction de  $(\delta_e + \delta_o)/2$ . L'incertitude déterminée par l'ajustement de la courbe expérimentale est utilisée pour calculer l'erreur en chaque point et est représentée par des barres d'erreurs sur le graphique. On réalise une régression linéaire des points expérimentaux. Les résultats sont présentés dans le Tableau 3.2.

On trouve une biréfringence de  $(9,07 \pm 0,09) \cdot 10^{-3}$  avec  $n_o=1,5458 \pm 3 \cdot 10^{-4}$  et  $n_e=1,5550 \pm 4 \cdot 10^{-4}$ . Cette valeur est très proche de la valeur tabulée prise comme référence de 0,0091 attestant de la justesse de la mesure. On voit que la mesure du  $\Delta n$  est plus précise que celle des indices. L'erreur commise pour la détermination du  $\Delta n$  est de  $0,03 \cdot 10^{-3}$  tandis que celle commise sur la détermination des indices est de  $1,6 \cdot 10^{-3}$ . Il

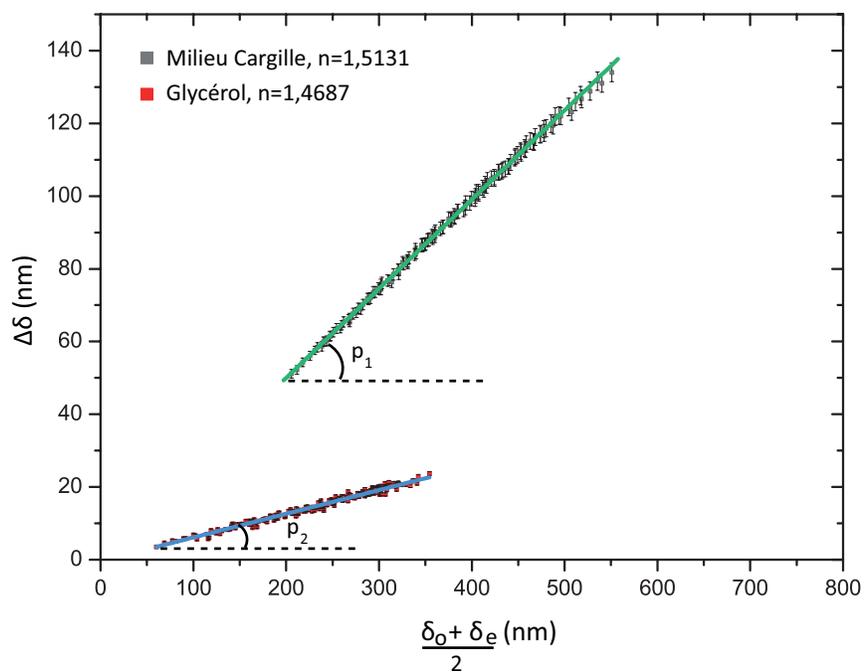


FIGURE 3.14 – Représentation en droite des indices de cristaux de quartz dans 2 milieux d’immersion différents. Observation et imagerie au grandissement total  $40\times$ ,  $ON=0,75$ .

Milieu d’immersion	Indice de réfraction du milieu	$p$
Cargille	1,5131	$0,2456 \pm 0,0003$
Glycérol	1,4675	$0,1105 \pm 0,0007$

Tableau 3.2 – Résultats des régressions linéaires obtenues pour les deux échantillons de  $\Delta\delta$  en fonction de  $(\delta_e + \delta_o)/2$ .

y a certainement un biais de mesure sur les valeurs d'indice qui pourrait être attribué au fait que les indices des deux milieux considérés (*i.e.* glycérol et huile Cargille) n'ont pas été mesurés pour cette expérience. Les indices théoriques des solutions pourraient ne pas correspondre aux indices réels des milieux utilisés.

### 3.5.1.3 Étude de fibres de collagène

Dans un second temps, on étudie un échantillon biologique contenant des fibres de collagène isolées issues de queue de souris. L'échantillon est fixé grâce à du paraformaldéhyde et entre lame et lamelle. L'imagerie est réalisée avec un grandissement total de  $80\times$  et un objectif à immersion d'ouverture numérique  $ON=1,3$ . Le  $\Delta n$  attendu est de  $3 \cdot 10^{-3}$  [111]. Les fibres considérées ont un diamètre de plusieurs microns (entre 1 et 5  $\mu\text{m}$  environ), le retard typique attendu varie entre quelques nm et une dizaine de nm. Les résultats sont présentés Figure 3.15.

La première image (3.15(a)) est une image d'OPD pour une polarisation quelconque d'une fibre de collagène d'épaisseur de quelques  $\mu\text{m}$ . La fibre est entourée de rebonds de plus faible amplitude que l'on identifie comme étant des artéfacts dus à la diffraction.

La seconde image (3.15(b)) est une image de retard créée à partir d'un stack de 18 images d'OPD. La fibre est mieux localisée sur cette image et on peut mettre en évidence des inhomogénéités au sein de la fibre qui paraissent plus ou moins denses.

Les images d'orientation des Figures 3.15(d) et (e) représentent l'orientation de l'axe optique de la fibre. On voit que l'axe optique est constant et suit la fibre ce qui est cohérent avec le fait que l'anisotropie créée par une fibre est structurelle.

On cherche maintenant à réaliser des mesures de biréfringence sur cet échantillon de collagène. Pour cela, sur différents champs de l'échantillon, on image plusieurs fibres. En supposant que les fibres sont homogènes et cylindriques, on évalue leur diamètre grâce à des profils tracés sur l'image d'OPD. Il suffit alors d'évaluer le retard moyen le long de la fibre afin d'en déduire la valeur de biréfringence grâce à la relation :  $\Delta\delta = \Delta n \times \text{épaisseur mécanique}$ .

Sur la Figure 3.15(b), on mesure un retard  $\Delta\delta = 9,5 \pm 1,5$  nm, correspondant au maximum de retard observé au niveau du profil, le long de la fibre (10 profils tracés comme celui de la Figure 3.15(c)). L'écart type des pixels de l'image de retard déterminé sur une zone vide de 20 x 20 pixels est de 0,35 nm.

On réalise la même opération pour différentes fibres. Les résultats sont présentés dans le tableau 3.3. On calcule l'erreur réalisée sur la mesure en évaluant l'erreur commise lors de la mesure de l'épaisseur de la fibre et en mesurant le bruit présent sur l'image de retard. L'erreur commise sur l'évaluation du diamètre de la fibre est une erreur estimée à la taille d'un pixel.

On utilise la relation suivante pour déterminer l'erreur sur l'évaluation de la biréfringence :

$$\left(\frac{\Delta(\Delta\delta)}{\Delta\delta}\right)^2 = \left(\frac{\Delta(\Delta n)}{\Delta n}\right)^2 + \left(\frac{\Delta e}{e}\right)^2 \quad (3.79)$$

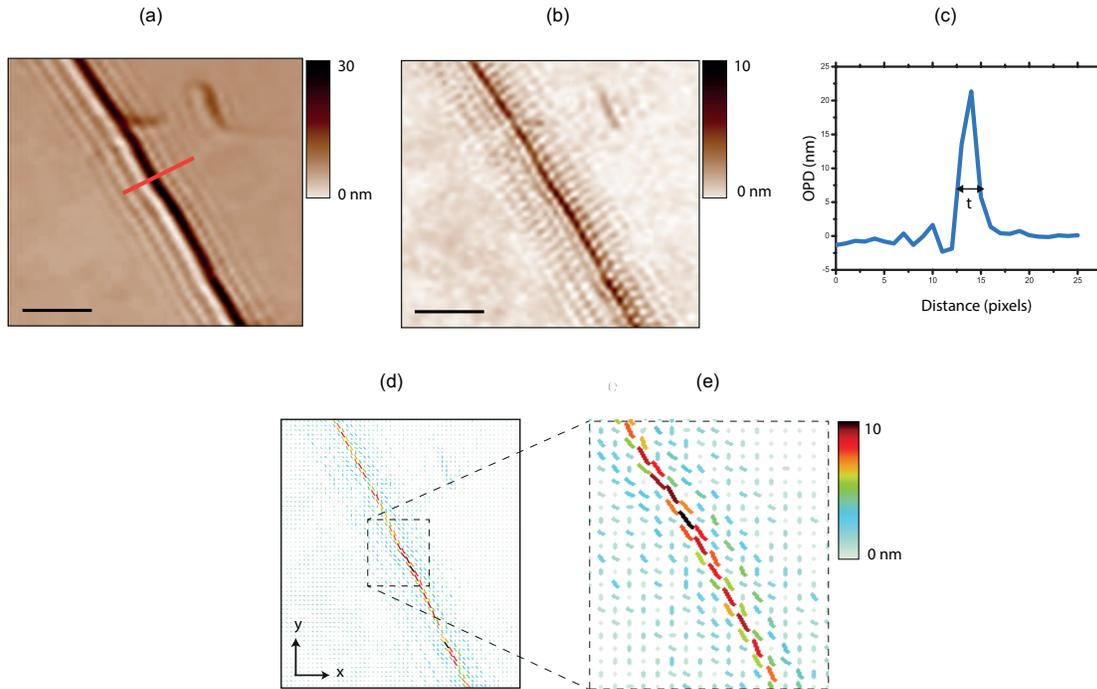


FIGURE 3.15 – Images d’une fibre de collagène. (a) OPD pour un angle de polarisation quelconque, (b) image de retard  $\Delta\delta$ , (c) profil de la fibre de collagène imagée tracé suivant le trait rouge sur l’image (a) et (d) & (e) image de contraste d’orientation. L’échelle tracée sur les images (a) et (b) représente  $5\ \mu\text{m}$ . (ON=1,3 grandissement total de  $100\times$ ).

$$\frac{\Delta(\Delta n)}{\Delta n} = \sqrt{\left(\frac{\Delta(\Delta\delta)}{\Delta\delta}\right)^2 + \left(\frac{\Delta e}{e}\right)^2} \quad (3.80)$$

$\Delta\delta$ (nm)	Diamètre de la fibre( $\mu\text{m}$ )	$\Delta n(10^{-3})$
$12,79 \pm 0,43$	$3,57 \pm 0,30$	$3,58 \pm 0,12$
$10,51 \pm 0,38$	$3,25 \pm 0,30$	$3,23 \pm 0,12$
$3,61 \pm 0,27$	$0,99 \pm 0,30$	$3,65 \pm 0,27$
$4,52 \pm 0,21$	$1,5 \pm 0,30$	$3,01 \pm 0,14$

Tableau 3.3 – Tableau récapitulatif des résultats obtenus sur différentes fibres de collagène. Observation au grandissement  $100\times$ , ON=1,3.

En conclusion, on trouve une valeur de biréfringence moyenne de  $3,37 \pm 0,34 \cdot 10^{-3}$ , ce qui est en accord avec la valeur trouvée dans la littérature de  $3 \cdot 10^{-3}$ . On est capable d’imager spécifiquement des fibres anisotropes, ici de collagène. On peut anticiper la plus petite fibre détectable avec notre technique. Pour 6 mesures,  $\Delta\delta_{\text{détectée}} = 1,5\ \text{nm}$  avec un  $\Delta n$  valant  $3 \cdot 10^{-3}$ . Le diamètre minimal de détection correspond à des fibres de diamètre

0,5  $\mu\text{m}$ . Dans le cas où l'on effectuerait 18 mesures,  $\Delta\delta_{\text{détectée}} = 1,5 \times \sqrt{\frac{6}{18}} = 0,87 \text{ nm}$  et le diamètre minimal des fibres serait de 289 nm soit à la limite de résolution du système.

### 3.5.2 Étude d'une bicouche lipidique

Maintenant que la technique a été validée et caractérisée, on peut commencer à étudier des échantillons biologiques plus complexes. Néanmoins, avant de s'intéresser à un échantillon de cellules, on se propose d'étudier des structures lipidiques servant de modèle pour l'étude des membranes biologiques.

On sait maintenant que les membranes sont des structures à la fois très organisées et très dynamiques. L'idée est de voir si l'on est capable avec notre technique de mettre en évidence et de mesurer l'ordre créé par cette structuration.

Une des méthodes d'étude de la dynamique membranaire est d'utiliser des sondes fluorescentes qui vont se comporter comme des lipides et se positionner au sein de la bi-couche dans des zones bien déterminées [112, 113]. Les caractéristiques des fluorophores (*i.e.* leur taille, la longueur de leur chaîne carbonée et le degré de saturation) peuvent avoir une influence très importante concernant leur répartition au sein de la membrane et donc sur ses caractéristiques de structuration et de fluidité.

L'étude de l'anisotropie de fluorescence permet ainsi de voir à quel point la membrane peut être organisée ou désorganisée par des facteurs extérieurs en regardant l'agencement des fluorophores au sein de celle-ci [8].

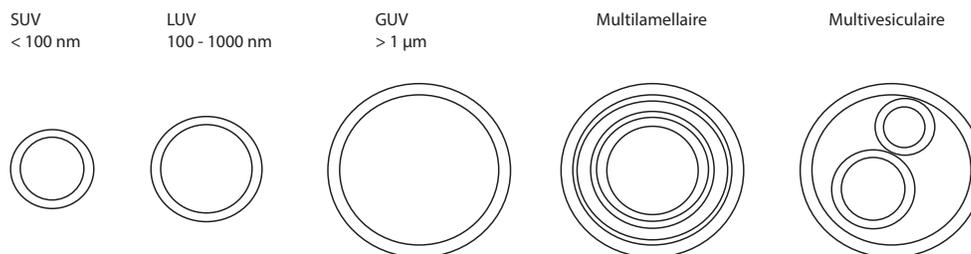


FIGURE 3.16 – Modèles de vésicules de dimensions différentes qui peuvent être créées artificiellement.

L'idée testée ici est d'étudier la probabilité d'observer et de mesurer cette désorganisation par imagerie de biréfringence. Les lipides sont des molécules amphiphiles possédant une tête hydrophile et une queue hydrophobe. Dans un milieu aqueux, ils s'organisent d'eux mêmes en vésicules appelées liposomes et constituées d'une bi-couche lipidique refermée sur elle-même (voir Figure 3.16). Ces structures peuvent être obtenues de façon artificielle en soumettant une mono-couche de lipides à un champ électrique variable, ce qui conduit à des vésicules de diamètres différents allant de la centaine de nanomètres à quelques microns. Les *giant unilamellar vesicles*, structures lipidiques de l'ordre de la taille de cellules eucaryotes ( $\approx 1 \mu\text{m}$  de diamètre) qui sont présentées dans l'étude suivante ont

été préparées en suivant le protocole de la méthode par électroformation développée par Angelova et Dimitrov [114]. Les lipides, issus d'une solution [DOPC]=1mM ont été dissous dans une solution de chloroforme/méthanol de rapport 9 :1. La solution permettant de réaliser les GUV est une solution de sucrose ([sucrose]=4g/50ml) et les GUV sont ensuite placées dans une solution de glucose ([glucose]=2,52g/50ml) afin de réaliser l'imagerie.

La bi-couche lipidique est un objet très peu déphasant, en effet, ces objets sont quasiment invisibles en intensité (voir Figure 3.17 par exemple). Au sein de cette bi-couche, les lipides sont agencés de façon à ce que seules leurs parties hydrophiles soient en contact avec l'eau. Les parties carbonées hydrophobes sont regroupées au sein de la bi-couche. Il existe différents types de lipides qui peuvent être utilisés. Dans cette étude, on utilisera des lipides de type DOPC pour Di-palmitol-phosphatidylcholine.

On image en premier lieu une GUV sans marquage fluorescent. Les résultats sont présentés Figure 3.17. Les deux premières images (b) et (c) sont respectivement des images d'intensité et d'OPD obtenues avec une illumination polarisée pour un angle  $\theta$  quelconque. Le contraste d'OPD permet de révéler la GUV qui est très peu visible en intensité ainsi qu'on peut le voir sur l'image (b). Le milieu intérieur et extérieur de la GUV est différent (glucose à l'extérieur et sucrose à l'intérieur), ce qui explique le fait que le milieu intérieur de la GUV paraisse plus dense que l'extérieur. L'image de retard de la Figure 3.17 (d) montre que la bi-couche lipidique est effectivement une structure ordonnée, le liquide isotrope à l'intérieur n'apparaît pas sur l'image laissant apparaître la bi-couche dont le signal n'excède pas 3 nm. Sur la Figure (e), on voit que l'orientation des éléments de base de la bi-couche est radiale, ce qui explique le contraste de l'image de retard.

A l'aide de plusieurs profils tracés sur l'image de retard, on détermine une valeur moyenne de retard, on trouve une valeur moyenne de 3,4 nm. La bi-couche n'étant pas résolue, il faudrait en théorie réaliser un modèle pour mesurer rigoureusement l'épaisseur réelle de la membrane puisque l'on sait qu'une bi-couche lipidique, du fait de la taille d'un lipide, mesure environ 4 nm.

On réalise maintenant une expérience identique sur des GUV marquées à l'aide d'une sonde fluorescente di-8-ANEPPQ-1-(3-sulfonatopropyl)-4-[beta [2-(di-n-o ctylamino)-6-naphtyl] vinyl] pyridinium betaine (Invitrogen). Ces sondes, du fait de leur structure en longue chaîne carbonée, sont biréfringentes et présentent une anisotropie de fluorescence lorsqu'elles sont intégrées au sein de la bi-couche.

Les résultats sont présentés dans la Figure 3.18. La principale différence entre les GUV marquées et non marquées réside dans le fait que les GUV marquées sont globalement plus contrastées. Ce phénomène est visible sur les images d'OPD polarisées (une cinquantaine de nm contre une trentaine de nm pour la GUV non marquée) et de retard (avec plus du double de signal pour la GUV marquée). Deux hypothèses peuvent être avancées. La première concerne le fait qu'un marquage non spécifique est présent au sein du milieu intérieur de la GUV. Ce marquage, constaté en fluorescence (non présenté dans ces travaux)

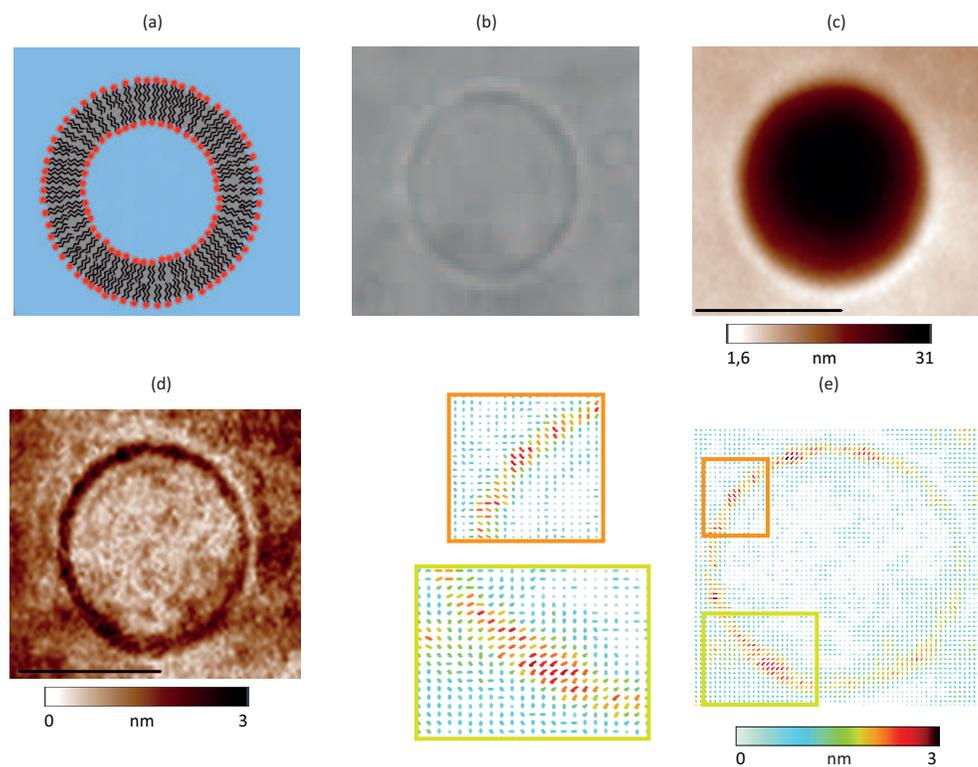


FIGURE 3.17 – Différentes représentations de l’observation d’une GUV (a) schéma illustratif, (b) en intensité, (c) en OPD, (d) en contraste de  $\Delta\delta$  et (e) représentation de l’orientation locale de l’axe optique. Observation au grossissement  $200\times$ , objectif  $100\times$ ,  $ON=1,3$ . Échelle =  $8\mu\text{m}$

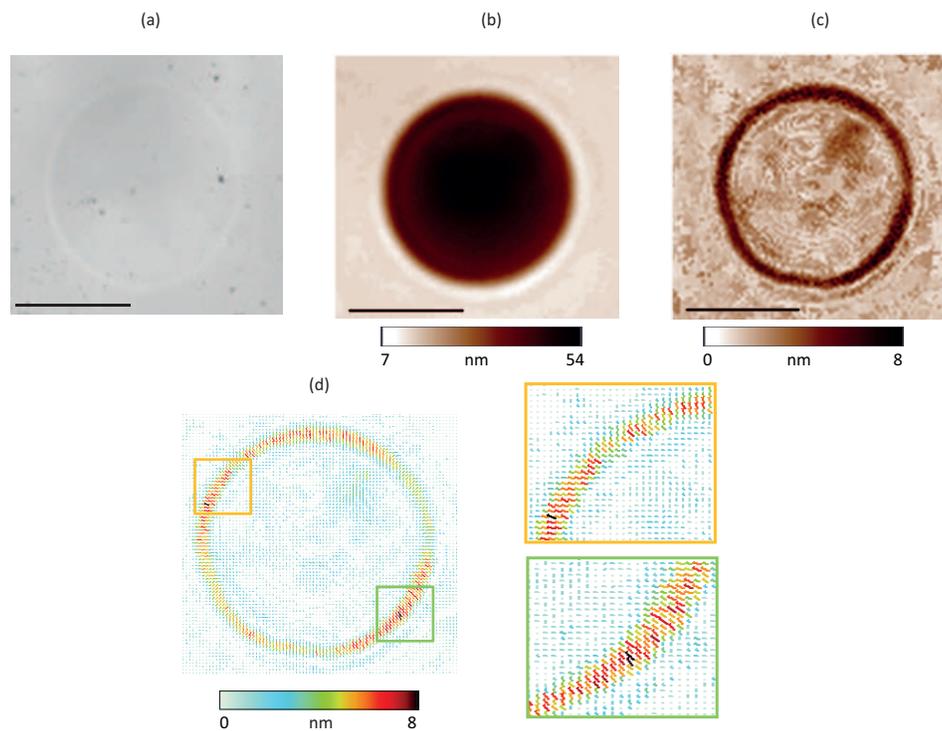


FIGURE 3.18 – Imagerie d'une GUV marquée au di-8-ANEPPQ (a) en intensité, (b) en OPD, (c) en contraste de  $\Delta\delta$ , et (d) représentation de l'orientation locale de l'axe optique. Observation au grandissement  $200\times$ , objectif  $100\times$ ,  $ON=1,3$ . Échelle =  $8\mu\text{m}$

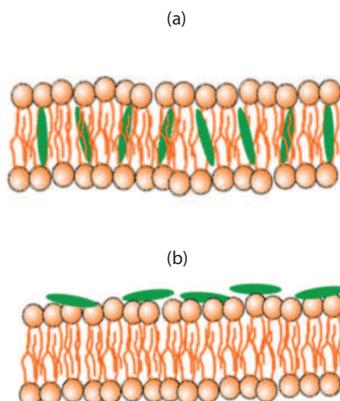


FIGURE 3.19 – Illustration de l'insertion de molécules fluorescentes au sein de (a) et orthogonalement à (b) la bi-couche lipidique

et témoin de la présence de fluorophores au sein de la GUV augmente l'indice de réfraction du milieu sans en modifier la biréfringence ( $\langle \Delta\delta \rangle = 0$  tandis qu'au sein de la membrane  $\langle \Delta\delta \rangle \neq 0$  comme on le constatera dans la suite de l'étude). La seconde hypothèse est que les molécules insérées au sein de la bi-couche augmentent l'épaisseur de la bi-couche ou du moins la quantité de matière au sein de cette dernière et ainsi en résulte une augmentation du déphasage.

Le retard moyen mesuré en moyennant 10 profils tracés sur l'image de retard (correspondant au maximum du profil) est de 6,5 nm soit presque 2 fois plus important que pour les GUV non marquées. Ceci met en évidence l'effet du marquage fluorescent sur la valeur de retard mesuré sur ces modèles de bi-couche lipidique. Différentes hypothèses peuvent expliquer cette mesure puisqu'on sait qu'avec notre mesure l'épaisseur mécanique et la biréfringence sont corrélés. Ainsi, on peut supposer de la même façon que :

- La molécule fluorescente augmente localement l'épaisseur de la membrane,
- La molécule fluorescente augmente localement le retard.

Les molécules fluorescentes peuvent s'insérer de différentes façons au sein de la bi-couche. On représente deux cas au niveau de la Figure 3.19.

Dans le cas où les molécules fluorescentes s'alignent avec les lipides au sein de la bi-couche (Figure 3.19(a)), elles augmentent l'ordre local en augmentant le nombre de molécules alignées de la même façon et par conséquent la biréfringence. Par contre, si les molécules s'orientent perpendiculairement à la membrane (Figure 3.19(b)), l'ordre local est diminué, les molécules fluorescentes et les lipides de la membrane étant orientées de façon différente. Une expérience complémentaire permettant de répondre à cette question serait donc d'utiliser une autre sonde fluorescente qui se comporte différemment en terme d'insertion au sein de la bi-couche lipidique, elle se placerait orthogonalement à la bi-couche et devrait réduire la biréfringence de l'ensemble. On mesurerait une valeur de retard  $\Delta\delta$  inférieur à celui mesuré dans l'expérience réalisée ici.

Des expériences similaires de mesure de l'ordre local en anisotropie de fluorescence ont été réalisées afin d'étudier des propriétés de fluidité membranaire [8]. Une comparaison directe

avec ce type de mesures pourrait être intéressante afin de comparer les résultats obtenus et d'étudier notamment l'influence de ces marqueurs fluorescents sur la membrane.

En conclusion, la technique de mesure développée apporte une information complémentaire à celle obtenue avec une technique d'anisotropie de fluorescence. On voit que des mesures relatives de retard et par conséquent d'ordre local peuvent être obtenues sur des échantillons très fins et modélisant la membrane cellulaire et ce, sans aucun marquage. Cette technique pourrait se révéler très intéressante dans le cas où l'on voudrait regarder l'effet d'un milieu ou d'un agent qui augmenterait ou diminuerait le niveau d'organisation de modèles membranaires (insertion de cholestérol au sein de la membrane par exemple).

### 3.5.3 Mesure de retard d'échantillons de cellules vivantes

#### 3.5.3.1 Cellules COS-7

Nous avons vu que l'on était en mesure de réaliser des mesures sur des échantillons fins dont le retard est de quelques nanomètres. On applique cette technique sur des échantillons biologiques tels que des cellules. Le premier échantillon est composé de cellules COS-7 vivantes. Ces cellules sont des pseudo-fibroblastes de rein de singe vert africain, immortalisées [115].

L'intérêt d'utiliser ce type de cellules réside dans le fait qu'elles s'étalent sur leur support rendant une grande partie de leur cytoplasme (*i.e.* milieu intérieur de la cellule) et leur membrane accessibles à une étude.

Afin de travailler de façon optimale pour garder l'intégrité de l'échantillon, l'atmosphère est contrôlée en terme de CO<sub>2</sub> et de température (5% CO<sub>2</sub> et 37°C).

L'observation et l'imagerie sont réalisées dans un milieu de culture adéquat (Dulbecco's Modified Eagle Medium, auquel on ajoute 10% de serum de veau foetal et du pyruvate de sodium). Les cellules sont placées dans un support circulaire en verre de 35 mm de diamètre de type  $\mu$ dish (Ibidi, Planegg, Germany).

On image une cellule fortement étalée sur le support et on réalise le set d'images de polarisation sur une zone du cytoplasme. La partie contenant le noyau a été sciemment évitée afin de pouvoir imager la membrane et les différentes fibres du cytoplasme, le déphasage introduit par le noyau étant bien supérieur à celui du reste de la cellule. Les résultats obtenus sont présentés en Figure 3.20.

Les cellules étant vivantes, le stack de polarisation est réduit à  $N=6$ .

Les images (a), (a1) et (a2) de la Figure 3.20 représentent une image d'OPD du set de polarisation et des agrandissements de zones particulièrement intéressantes de la cellule en ce qui concerne les structures anisotropes.

Les images (b), (b1) et (b2) de la Figure 3.20 sont les images en contraste de  $\Delta\delta$  correspondant aux images (a), (a1) et (a2) de la figure. Ces images permettent de mettre en évidence les structures anisotropes de la cellule. On voit que le cytoplasme disparaît majoritairement au profit des différentes fibres, de certaines zones de la membrane plasmique délimitant la zone intra- de la zone extra-cellulaire et de certains organelles de la cellule.

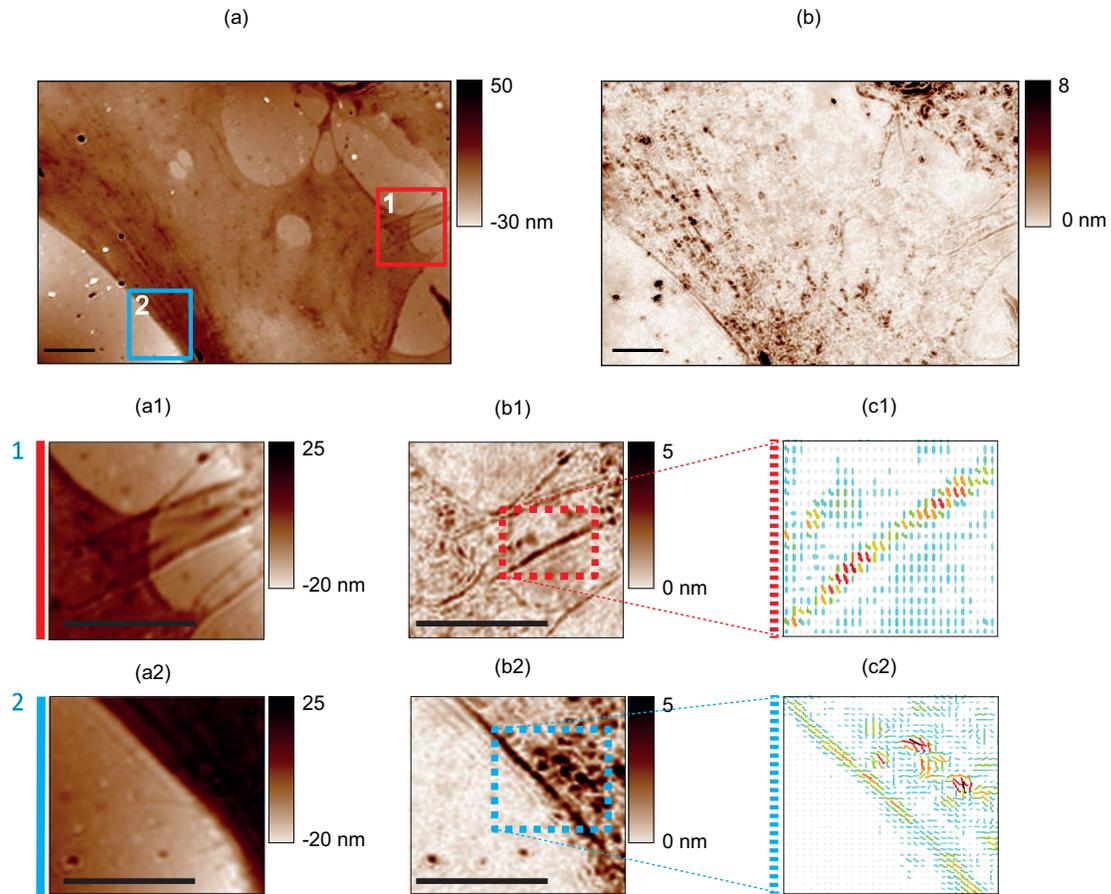


FIGURE 3.20 – Images en contraste (a) d'OPD, (b) de retard  $\Delta\delta$ , avec (a1, a2) agrandissements des zones délimitées par les rectangles 1 & 2 de l'image (a), de retard (b1, b2)  $\Delta\delta$ , et (c1, c2) orientation des zones délimitées par les rectangles en pointillés des images (b1) et (b2). L'échelle représente 6  $\mu\text{m}$ . (ON = 1,3 et grandissement total de 200 $\times$ ).

On voit que le signal provenant des fibres est faible, on peut l'évaluer à  $\approx 5$  nm. On peut noter qu'il est également très dépendant du focus : hors focus, on n'observe que le signal provenant des bords de la fibre, la fibre apparaît comme dédoublée contrairement au cas où les fibres sont au focus et où le signal est plus fort et provient du centre de la fibre. Ceci provient notamment du fait que ces fibres sont très petites.

Les fibres semblent être des fibres de stress essentiellement composées de microfilaments d'actine et qui sont responsables du maintien de la structure de la cellule ainsi que de sa motilité. Une comparaison avec une imagerie de fluorescence avec un marquage de l'actine, principal constituant des fibres de stress et du cytosquelette, pourrait nous aider à confirmer la nature de ces fibres. C'est ce qui est proposé en 3.5.3.2

Pour l'instant, on ne peut pas conclure sur la nature du signal provenant des vésicules sur l'image de retard de biréfringence. Ce signal pourrait représenter un signal de biréfringence aussi bien qu'un biais dû à un mouvement des vésicules entre le début et la fin de l'acquisition. En effet, il est possible que le contenu des vésicules soit biréfringent et il est donc intéressant de pouvoir avoir une information sur la nature de ces vésicules. Ce problème pourrait être résolu grâce à une mesure plus rapide de biréfringence. C'est un projet qui fait l'objet d'une étude actuellement. Une idée serait également d'étudier de plus près le résiduel de la régression linéaire pour voir si la matrice de bruit est la même pour les vésicules et pour les fibres.

On représente également l'orientation locale des structures anisotropes présentes sur les images (b1) et (b2) (Figures 3.20 (c1, c2)). Il est intéressant de noter que les deux fibres qui sont mises en évidence dans les zones agrandies (b1, b2) et (c1, c2) ont des orientations différentes. L'une possède une orientation suivant son axe principal et l'autre possède une orientation perpendiculaire. Ceci peut provenir de l'orientation des monomères d'actine durant la polymérisation.

### 3.5.3.2 Mesures avec une configuration multimodale OPD/fluorescence

Pour prouver que les fibres mises en évidence par notre technique sont bien constituées d'actine, on réalise une expérience de multi-modalité OPD/fluorescence afin de pouvoir imager la même zone d'un échantillon simultanément en OPD et en fluorescence. Ceci a déjà été réalisé auparavant afin de montrer l'intérêt de l'association d'informations et de nature différente obtenues en simultané sur le même échantillon [12].

Cette expérience est réalisée sur les cellules très mobiles de type HT1080 Lifeact déjà utilisées partie 2.5.6.1. Le marquage fluorescent est homogène et permet surtout de visualiser la membrane plasmique ainsi que quelques fibres au sein de la cellule. On note un fond de signal de fluorescence présent au sein de la cellule et visualisable sur la Figure 3.21 (c). Les cellules sont placées dans un milieu MEM + Glutamax (Invitrogen, Cergy-Pontoise, France) avec 10% de serum de veau foetal et 0,1 mg/ml de Geneticin. De même que précédemment, l'atmosphère est contrôlée en terme de  $\text{CO}_2$  et de température (avec 5%  $\text{CO}_2$  et une température de 37°C) dans l'enceinte thermostatée. Les cellules sont imagées dans

un support de type  $\mu$ dish. Les cellules étant mobiles, le stack de polarisation est réduit à  $N=6$  polarisations différentes.

Les résultats sont présentés en Figure 3.21.

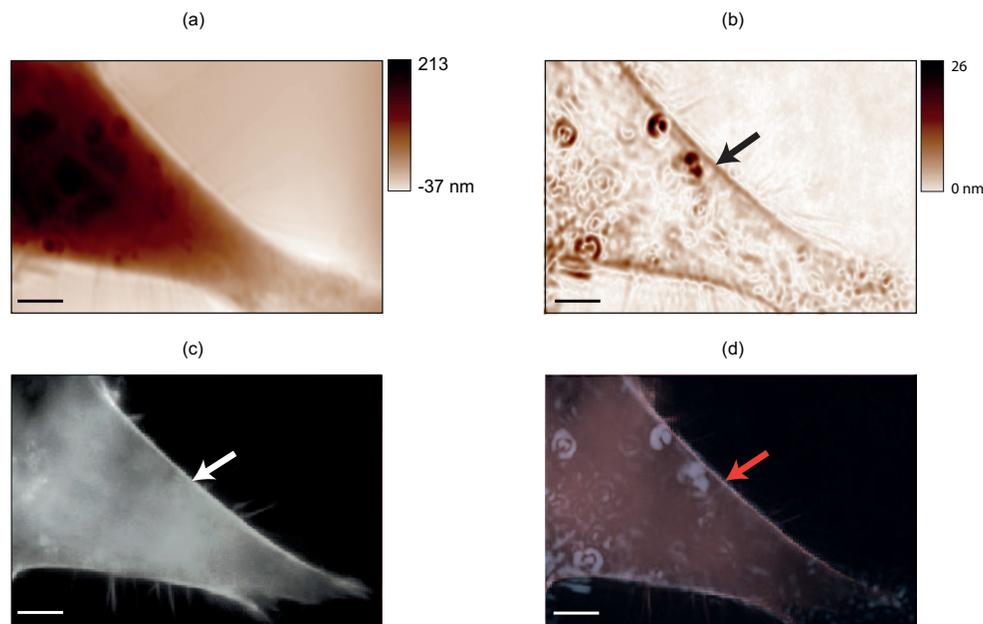


FIGURE 3.21 – Cellules HT1080 Lifeact avec marquage GFP F-actine. Images (a) d’OPD, (b) de retard  $\Delta\delta$ , (c) de fluorescence et (d) composite des images (b)&(c). L’échelle sur l’image représente  $6 \mu\text{m}$ . (ON=1,3 et grandissement total  $200\times$ ).

La première image (Figure 3.21 (a)) est une image d’OPD polarisée du stack nous montrant une partie de la cellule imagée. On visualise une partie du noyau qui correspond à une partie plus dense de la cellule au sein duquel on distingue des nucléoles (zones très denses au sein du noyau de dimension de l’ordre de  $5 \mu\text{m}$ ) et des vésicules (structures denses plus petites de dimension de l’ordre de quelques  $\mu\text{m}$  de diamètre).

La membrane plasmique est l’élément anisotrope ayant la plus grande valeur de retard sur l’image Figure 3.21 (b). On peut voir en périphérie de la membrane des petites fibres qui se révèlent également en fluorescence sur l’image Figure 3.21 (c), attestant du fait qu’elles sont composées d’actine.

La dernière image ( Figure 3.21 (d)) est une image composite issue de la fusion des images (b) et (c) de la Figure 3.21. On voit que les signaux de retard et de fluorescence de la membrane plasmique et de certaines fibres se superposent et semblent colocalisés sur les 2 images.

Le marquage de l’actine confirme que le contraste permet d’identifier des fibres de stress de la cellule. Ces fibres sont composées d’actine et représentent le composant anisotrope

majoritairement mis en évidence grâce à notre technique.

## 3.6 Conclusion

Nous avons décrit une nouvelle technique pour réaliser une imagerie de biréfringence d'échantillons biologiques vivants qui peut être implémentée sur tout microscope classique avec un unique polariseur pour exciter l'échantillon avec différentes polarisations.

En réalisant différentes acquisitions d'images d'OPD polarisées, on peut augmenter spécifiquement le contraste pour les structures anisotropes contenues dans un échantillon. On a montré que l'on était en mesure de différencier les structures isotropes des structures anisotropes sur nos images.

Les images de retard permettent une meilleure localisation spatiale de composants sub-cellulaires. Dans le cas d'échantillons de cellules, on a constaté que l'augmentation de contraste est surtout spécifique des fibres de la cellule.

La résolution de la technique en terme de mesure de retard de biréfringence a été évaluée à 0,58 nm en moyenne pour 6 acquisitions et correspond à la résolution de l'image de retard. La limite de détection est estimée à 1,16 nm (correspondant à  $2\sigma$ ). La résolution de l'image de retard peut être évaluée dans une zone vide de l'échantillon pour chaque expérience car elle peut dépendre des conditions expérimentales. On a pu constater que la nature vivante ou fixée des cellules pouvait augmenter le bruit de mesure en raison de mouvements de liquides par exemple. Cette résolution a été évaluée sur une zone de 20 x 20 pixels d'un échantillon de collagène entre lame et lamelle à 0,54 nm. La valeur limite de détection de signal d'anisotropie dans le cas de cet échantillon est de 1,1 nm. Il peut donc être nécessaire de mesurer cette valeur dans chaque configuration.

Les erreurs et incertitudes de mesure ont été caractérisées expérimentalement sur différents types d'échantillons et grâce à une simulation numérique afin de déterminer le domaine de validité de la mesure. On a ainsi établi que la mesure de retard était réalisée avec moins de  $10^{-2}$  nm d'erreur sur la valeur de retard  $\Delta\delta$  lorsque le retard de l'échantillon était inférieur à une dizaine de nm.

En ce qui concerne la détermination de l'orientation de l'axe optique  $\theta_0$ , la mesure est réalisée avec moins d'un centième de degré d'erreur pour des valeurs de retard allant jusqu'à 1  $\mu\text{m}$  et avec moins d'un dixième de degré pour des valeurs de  $\Delta\delta$  de 3  $\mu\text{m}$ . On peut donc en conclure que nous sommes plus limités par le bruit que par notre approximation de faible retard.

Nous avons montré la capacité de la technique à réaliser des mesures de biréfringence pour des éléments connus tels que des cristaux de quartz et des fibres de collagène. On a ainsi éprouvé la justesse de la mesure par deux moyens différents (*i.e.* changement de milieu d'immersion et détermination de l'épaisseur locale) en montrant que l'on pouvait déterminer une biréfringence du quartz  $(9,1 \pm 0,09) \cdot 10^{-3}$  pour une biréfringence de référence valant  $9 \cdot 10^{-3}$  et celle de fibres de collagène estimée à  $3,4 \pm 0,3 \cdot 10^{-3}$  et proche de

celle trouvée dans la littérature de  $3 \cdot 10^{-3}$ . On peut donc faire la différence entre différents matériaux ou fibres au sein d'un échantillon grâce à notre mesure.

### 3.7 Perspectives : mesure de biréfringence rapide

Dans le cas d'échantillons mobiles, le problème de la dynamique cellulaire entraîne l'apparition d'artéfacts sur les images. Ceci est dû au fait que le changement de polarisation est fait par un moyen mécanique. Une nouvelle solution utilisant un cristal liquide est à l'étude afin de diminuer la durée d'acquisition et éviter les biais de mesure entraînés par les mouvements de l'échantillon. On passerait ainsi d'une dizaine de secondes à une acquisition en deçà de la seconde. En ce qui concerne la capacité à détecter des structures plus fines, on sait que l'on pourrait accroître la résolution de la mesure d'OPD en utilisant une caméra rapide permettant de moyennner les acquisitions très rapidement.

Une des perspectives en cours de développement est la mesure de biréfringence à l'aide d'un composant permettant de faire tourner la polarisation rapidement.

---

### Reconstruction tridimensionnelle d'échantillons biologiques

---

Ce dernier chapitre est consacré à l'imagerie et à la reconstruction tridimensionnelle d'échantillons biologiques épais. La problématique est la suivante : dans le cadre du modèle projectif, le déphasage est accumulé tout au long de la propagation à travers l'échantillon. Si l'on considère des échantillons comportant plusieurs couches de cellules, que mesure l'analyseur ? Normalement, on s'attendrait à une superposition de couches individuelles. Cependant, grâce aux effets de profondeur de champ, on montrera dans quelle mesure ces couches sont discernables et comment en tirer de l'information quantitative.

La caractérisation de la méthode sur des objets connus et des résultats seront présentés à la suite du développement théorique expliquant les principes physiques de la méthode. L'essentiel du développement théorique a été réalisé par Pierre Bon durant ses travaux de thèse et de post-doctorats tandis que mon travail a été le développement expérimental.

## 4.1 Introduction

### 4.1.1 Contexte

Le passage de l'étude de mono-couches cellulaires à des cultures tridimensionnelles est motivé par le besoin de travailler avec des modèles cellulaires dans un état le plus proche possible de celui dans lequel ils sont au sein d'un organisme vivant. Les fonctions élémentaires des cellules qui sont présentes au sein des tissus sont manquantes au niveau de cellules en culture et ceci limite notre compréhension des fonctions cellulaires dans des organismes réels [116]. L'architecture spécifique, les communications, qu'elles soient de nature biochimique ou mécanique sont tridimensionnelles. En prenant l'exemple des neurones, on sait qu'ils interagissent entre eux ainsi qu'avec la matrice extra-cellulaire constituée des cellules gliales et leurs différentes terminaisons nerveuses afin de faire passer l'information d'un

secteur à un autre du cerveau. L'intérêt d'étudier des tissus ou des gels tridimensionnels plutôt que des cultures cellulaires bidimensionnelles est donc de conserver cette organisation.

De ce fait, il est impératif de pouvoir accéder à cette 3<sup>ème</sup> dimension d'un échantillon au niveau de l'imagerie quelle que soit l'épaisseur de l'échantillon puisqu'on sait que cette information peut donner un aperçu de sa structuration et des interactions des différents éléments.

Une imagerie tridimensionnelle peut aussi avoir un intérêt pour mesurer des couches cellulaires, des épaisseurs ou localiser des organelles au sein d'un échantillon.

On a vu précédemment que le régime projectif permettait de réaliser des quantifications dans le cadre d'échantillons pour des objets dont l'épaisseur physique n'excédait pas une dizaine de microns. Une des principales limitations de ce régime est qu'on ne peut pas décorrélérer l'indice de réfraction de l'épaisseur. Par conséquent, si l'on a un moyen de mesurer l'épaisseur, alors on peut en déduire l'indice. L'intérêt de mesurer l'indice de réfraction est que c'est une mesure intrinsèque du milieu alors qu'une intensité ou une phase n'en sont que des révélateurs dépendant de la technique et de la méthode de mesure. Une seconde limitation de cette approximation est qu'elle ne permet pas la quantification d'objets dont la dimension axiale excède la profondeur de champ du système d'imagerie limitant l'étude à des échantillons fins (environ une dizaine de microns). Si l'on veut étudier des échantillons de tissus, cette limitation doit être dépassée. L'objet de ce chapitre est de montrer comment on peut réaliser des images interprétables en terme d'OPD ainsi que des mesures d'épaisseur et ce, sur des échantillons de plusieurs dizaines de microns d'épaisseur mécanique.

Par construction, le microscope conventionnel permet uniquement de visualiser des échantillons suivant les deux dimensions du plan focal. Une information en 2 dimensions peut être perçue comme une information partielle d'un échantillon. Cependant, par déplacement du plan focal à travers l'échantillon, on peut acquérir une pile d'images 2D à partir desquelles on peut reconstruire une image en 3D de l'échantillon. Cette technique est appelée technique des coupes sériées et est réalisée à l'aide de ce qu'on appellera par la suite un z-scan (scan suivant l'axe optique z du système). Ce dernier peut être effectué soit en déplaçant l'échantillon par rapport à l'objectif soit en déplaçant l'objectif grâce à une platine motorisée ou un piézo électrique. C'est notamment cette dernière configuration plus pratique à implémenter qui est le plus souvent utilisée.

Dans le Chapitre 2, j'ai présenté le modèle projectif pour interpréter les images de phase ainsi que ses limites, notamment en ce qui concerne l'effet de la mise au point. Pour des échantillons épais de plusieurs dizaines de microns, la mesure n'est plus directement interprétable. En effet, leur épaisseur est alors supérieure à la profondeur de champ du système d'imagerie. On tâchera de montrer dans ce chapitre que l'effet de la mise au point, concernant les échantillons fins et par extension pour les échantillons épais, peut être résolu et que l'imagerie des échantillons sera possible jusqu'à une centaine de microns d'épaisseur plan par plan en vue d'une reconstruction tomographique.

Il est toutefois important de souligner que l'imagerie fonctionne dans ce cas mais que l'information obtenue n'est que qualitative. L'objet de ce chapitre est de montrer comment cette quantification peut être retrouvée.

Cette nouvelle application de l'imagerie de phase quantitative a été développée pour permettre une imagerie et une quantification de la matière tranche par tranche. La quantification est possible pour des éléments épais (de l'ordre de la centaine de microns), mais également pour des éléments à l'intérieur de l'échantillon (organites cellulaires dans le cas de l'étude de cellules ou cellules dans le cas de l'étude de tissus).

Il existe différentes techniques pour reconstruire une image tridimensionnelle des échantillons biologiques qui peuvent être classés en deux grandes familles, en fonction de leur caractère *champ large* ou *balayage point par point*. Certaines sont basées sur une illumination de l'échantillon ou une émission de lumière de nature incohérente spatialement et nécessitent un z-scan, d'autres, sont basées sur une illumination cohérente et nécessitent un balayage angulaire de l'illumination ou une rotation de l'échantillon.

## 4.1.2 Techniques d'imagerie 3D

Dans cette partie, on décrira différentes techniques regroupées dans deux grandes catégories selon qu'elles permettent une imagerie qualitative ou quantitative d'échantillons épais. On commencera par présenter les techniques qualitatives constituées des techniques de fluorescence, notamment les techniques de super-résolution, permettant d'imager des échantillons en 3D ainsi que la tomographie par cohérence optique (ou *OCT*). Dans un second temps, on présentera les techniques quantitatives constituées des techniques de tomographie diffractive.

### 4.1.2.1 Imagerie qualitative

Les techniques basées sur le phénomène de fluorescence comme la microscopie confocale ou les techniques de super-résolution permettent de réaliser des images en 3D d'un échantillon avec, respectivement, des résolutions latérales et axiales de  $\Delta_{x,y} \approx 180$  nm et  $\Delta_z \approx 500$  nm pour le microscope confocal [117] et à  $\Delta_{x,y} \approx 20-30$  nm et  $\Delta_z \approx 50-60$  nm pour la technique de super résolution STED (*pour* Stimulated Emission Depletion microscopy) [118].

La résolution est un critère majeur en imagerie qui va permettre de résoudre les échantillons imagés en détail. Pour la microscopie STED, l'inconvénient peut être qu'elle nécessite un balayage latéral (c'est une technique d'imagerie dite *point par point*). Pour les techniques de type STORM [119] (*pour* Stochastic Optical Reconstruction Microscopy) ou PALM [120] (*pour* PhotoActivated Localization Microscopy), on peut obtenir des images d'échantillons en champ large et très résolues ( $\Delta_{x,y} \approx 20-30$  nm et  $\Delta_z \approx 50-60$  nm pour le PALM et  $\Delta_{x,y} \approx 20-30$  nm et  $\Delta_z \approx 50-60$  nm pour le STORM). Ces techniques sont la plupart du temps bidimensionnelles du fait de la symétrie de la PSF (ou "Point Spread Function") autour du point de focalisation et le passage à la 3D présente de nombreuses

difficultés. Dans le cas où l'étude d'un échantillon est limitée à quelques centaines de nanomètres, on peut envisager de déformer cette PSF afin de casser sa symétrie axiale de telle sorte qu'il y ait une relation entre la forme de la PSF et la position axiale de l'émetteur par rapport au plan focal du système d'imagerie. On peut citer différentes méthodes introduisant de l'astigmatisme en utilisant une lentille cylindrique [121], en créant une PSF en hélice [122] ou utilisant la méthode bi-planaire [123].

Dans le cas où l'on désire étudier un échantillon sur une centaine de microns, comme c'est généralement le cas en microscopie, un z-scan doit obligatoirement être effectué ce qui augmente drastiquement le temps d'imagerie.

On se doit de souligner deux autres atouts de l'utilisation de la fluorescence dans le cadre de l'imagerie en 3D. Le premier, que l'on a déjà mentionné dans le premier chapitre de ce manuscrit, est le caractère spécifique de l'information collectée. On peut localiser une molécule de façon spécifique en profondeur dans un échantillon et ce, avec un très bon contraste, le signal apparaissant clair sur fond noir. Notons que ceci permet également une représentation 3D finale simple d'interprétation. Le second atout est la facilité de créer une image 3D de fluorescence d'un échantillon car elle ne nécessite qu'un balayage axial de l'échantillon grâce à une translation de l'objectif, chaque molécule fluorescente agissant comme un seul point source et les interférences entre les différents points étant négligeables. On peut déjà également mettre en avant la possibilité d'améliorer la résolution des images et de rehausser certaines fréquences de l'image en fonction du RSB (pour *rapport signal sur bruit*). Ces techniques sont généralement couplées à des techniques de déconvolution en 3D d'images (le processus de convolution sera traité plus loin en partie 4.2.7.1).

La déconvolution nécessite la détermination de la PSF qui est simple dans ce cas puisqu'elle est définie uniquement par le système d'imagerie.

Ce point est non négligeable et on verra dans la suite de ce travail qu'il est sera plus compliqué d'implémenter une déconvolution 3D en ce qui concerne notre technique de phase quantitative où l'on doit prendre en compte également l'effet de l'imageur de phase.

Parmi les techniques qui apportent un contraste purement qualitatif d'un échantillon épais, la tomographie par cohérence optique (ou *OCT*) permet de créer un effet de sectionnement optique grâce à un phénomène d'interférences qui n'apparaît que dans une certaine tranche de l'échantillon [124]. La résolution en z des images, allant jusqu'au micron, est modulable et dépendante de la largeur spectrale de la source. L'atout de l'OCT est que l'imagerie peut être réalisée jusqu'à quelques millimètres de profondeur avec un bon contraste. Ce dernier permet de réaliser des images où des différences morphologiques ou structurelles sont visualisables sur des échantillons épais [125] afin de réaliser des diagnostics et permettrait de guider la réalisation d'une chirurgie par exemple.

### 4.1.2.2 Imagerie quantitative

L'utilisation de techniques de phase quantitative a rendu possible la reconstruction d'indice de réfraction complexe en trois dimensions d'échantillons semi-transparents. Ces techniques vont permettre une imagerie plan par plan d'un échantillon grâce à un phénomène de sectionnement optique. La majeure partie d'entre elles est constituée des techniques de tomographie diffractive basée sur de l'holographie numérique [126, 127, 128]. En effet, il est nécessaire d'enregistrer le champ  $\mathcal{EM}$  diffracté par l'échantillon en terme d'intensité et de phase pour remonter à une mesure de l'indice de réfraction.

Le principe de ces techniques repose sur l'utilisation de conditions d'illumination oblique afin de reconstruire de la façon la plus complète possible le champ diffracté par l'échantillon. La Figure 4.1 présente de façon très simplifiée ce principe. Du côté de l'interprétation, on utilise une analogie simple : celle de regarder un objet par le côté comme c'est le cas en utilisant une illumination oblique. De ce fait, on va pouvoir avoir une idée de la structuration en  $z$  de cet échantillon.

Sur la Figure 4.1, en éclairant l'objet par le côté on voit apparaître la bille du dessous.

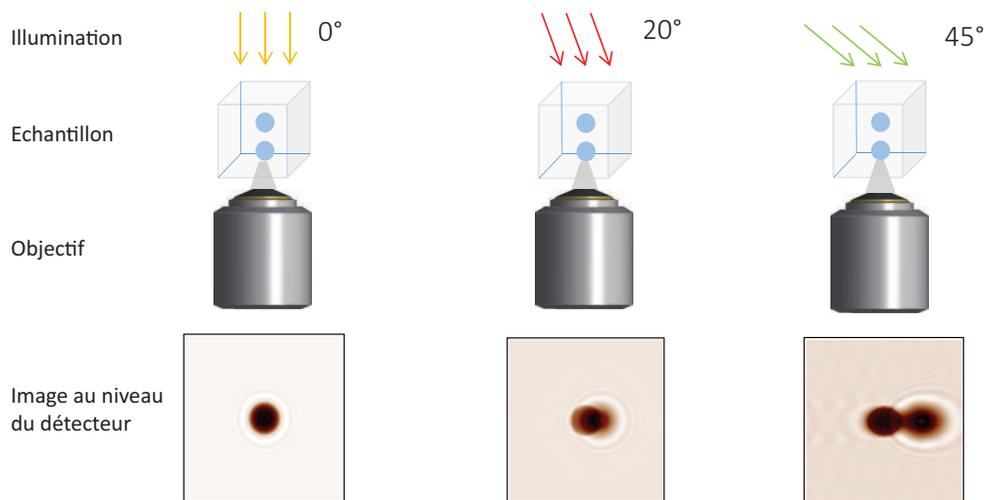


FIGURE 4.1 – Représentation schématique de l'effet sur l'imagerie de l'utilisation d'un éclairage oblique.

Les acquisitions successives des composantes phase et intensité du champ diffracté sont effectuées avec une rotation de l'illumination ou de l'échantillon puis les mesures sont combinées numériquement dans l'espace de Fourier. On utilise ensuite la formule de Born pour retrouver l'indice. Ces techniques présentent l'avantage d'un gain en résolution axiale et latérale de près de deux fois comparé à l'utilisation d'une illumination spatialement cohérente.

Un des inconvénients de ces techniques est qu'elles s'appuient sur l'utilisation d'approximations, notamment l'approximation paraxiale, en raison du caractère cohérent de l'illumination utilisée qui empêchent leur utilisation pour des objets très diffractants ou trop

épais. En effet, pour l'instant, ont été présentées uniquement des reconstructions d'objets biologiques dont les dimensions étaient de l'ordre de la dizaine de micromètres au maximum avec des échantillons tels que des prolongements de neurones [129], des diatomées [126] ou des grains de pollen [126]. Expérimentalement, l'inconvénient majeur réside dans le fait qu'elles nécessitent un système de balayage de l'illumination ou de rotation de l'échantillon ainsi qu'un grand nombre d'acquisitions (près de 500 à 1000 angles pour une reconstruction). Leur implémentation sur un microscope n'est donc pas immédiate, le montage doit être dédié et l'acquisition ne peut être effective que sur échantillon fixé dans le cas où l'on veut tourner l'échantillon.

Dans le cas où on réalise un balayage de l'illumination, un compromis doit être trouvé entre remplissage de l'espace fréquentiel et durée de l'acquisition. En effet, à titre indicatif, une durée moyenne d'acquisition est de 30 minutes pour 1000 hologrammes [22]. Il existe néanmoins à notre connaissance un montage [19] permettant de réaliser ce type d'acquisitions en 10 secondes et qui le rend donc compatible avec un échantillon vivant.

Le principe de la tomographie diffractive est le suivant [130] : en utilisant des illuminations angulaires successives, on calcule le champ diffusé dans le plan du détecteur grâce à la mesure de ses composantes phase et intensité. Le principe sera vu plus en détail dans la suite de ce manuscrit.

On résume les caractéristiques des techniques évoquées dans ce chapitre en fonction de différents critères tels que le caractère quantitatif, la nécessité de cohérence spatiale ou encore la résolution dans le Tableau 4.1.

#### 4.1.2.3 La cohérence spatiale en microscopie

On se propose d'utiliser le principe de la tomographie diffractive avec notre technique de phase quantitative mais en utilisant une illumination spatialement incohérente. La faisabilité de la méthode a été montrée précédemment [33]. La différence entre illuminations spatialement cohérente et incohérente est schématisée dans la Figure 4.2. Un point de la source d'illumination constitue un angle d'illumination. Plus la source est étendue spatialement et plus il y a d'angles d'illumination. Inversement, plus la source est ponctuelle et plus on réduit le nombre d'angles d'illumination. L'illumination est alors considérée comme quasi-cohérente spatialement.

Les avantages du sectionnement optique apporté ne sont pas toujours compatibles avec la méthode de mesure de phase. En effet, on ne peut citer que quelques techniques capables de réaliser une mesure dans le cadre d'une faible cohérence temporelle [26, 37, 133, 29, 38, 40] ou spatiale [17, 134, 40] sans souffrir d'artéfacts au niveau des images. On a montré [41] que l'on pouvait réaliser une mesure avec notre technique avec une source spatialement et temporellement incohérente. Dans notre cas, les différentes illuminations angulaires sont envoyées en même temps sur l'échantillon. On verra par la suite comment les outils utilisés en tomographie diffractive ont été adaptés afin de procéder à une reconstruction de l'échantillon en 3D. Les principaux avantages de notre technique que l'on

Grandeur	Technique	Caractère quantitatif	Nature du balayage	Coh. temp.	Coh. spatiale	Résolution $\Delta x, y/z$
Fluorescence	Microscopie confocale	Non	x,y,z	Incoh.	Incoh.	$\Delta_{x,y}=180$ nm $\Delta_z=500$ nm
	STED	Non	x,y, z (Imagerie jusqu'à 150 nm sans scan)	Incoh.	Incoh.	$\Delta_{x,y}=10-20$ nm [131] $\Delta_z=30-40$ nm [132]
	PALM	Non	x,y, z (Imagerie jusqu'à 150 nm sans scan)	Incoh.	Incoh.	$\Delta_{x,y}=20-30$ nm [121] $\Delta_z=50-60$ nm [121]
	STORM	Non	x,y, z (Imagerie jusqu'à 150 nm sans scan)	Incoh.	Incoh.	$\Delta_{x,y}=20-30$ nm [121] $\Delta_z=50-60$ nm [121]
Intensité	OCT	Non	z	Incoh.	Coh.	$\Delta_{x,y} \approx 200$ nm [124] $\Delta_z \approx \mu\text{m}$ [124]
Intensité & phase	Tomographie diffractive par DHM	Oui	Illumination	Coh.	Coh.	$\Delta_{x,y} \approx 120$ nm [22] $\Delta_z=340$ nm [22]
	ID4L	Oui	z	Incoh.	Incoh.	$\Delta_{x,y} \approx 120$ nm $\Delta_z=340$ nm

Tableau 4.1 – Tableau récapitulatif des caractéristiques des techniques présentées dans le cadre d'une reconstruction d'échantillon. Les valeurs présentées sont les valeurs théoriques prenant en compte un indice de l'air et une longueur d'onde  $\lambda$  de 633 nm.

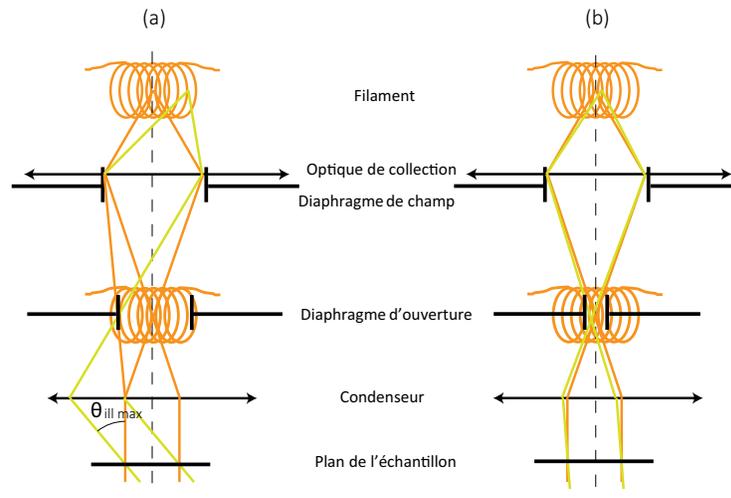


FIGURE 4.2 – Représentation schématique d'un montage d'illumination de Köhler. (a) Cas d'une illumination incohérente qui peut être réalisée en ouvrant le diaphragme d'ouverture, (b) cas d'une illumination quasi-cohérente réalisée en fermant au maximum le diaphragme d'ouverture.

tâchera de montrer est que l'on peut travailler avec une illumination incohérente sur tout microscope conventionnel puisque l'on ne modifie aucun composant du système natif. On verra cependant que l'utilisation d'une illumination incohérente s'accompagne d'une chute de contraste qui devra être compensée afin de garder le côté quantitatif de la mesure.

## 4.2 Modélisation des images de phase en illumination incohérente

### 4.2.1 Approche fréquentielle de la formation des images

La modification de la cohérence spatiale de l'illumination crée un phénomène de sectionnement optique dans le cas où un objet est imagé. Plus les dimensions de l'objet sont faibles et plus il sera sectionné.

Ce sectionnement optique se traduit dans l'espace des fréquences spatiales comme un gain en résolution axiale. Dans cette partie, on montrera l'origine de ce gain ainsi que celui d'un facteur 2 sur la résolution latérale. L'effet de l'incohérence spatiale de l'illumination sur l'interférogramme ainsi que sur la mesure d'OPD seront traités afin de comprendre comment une reconstruction d'indice est réalisée dans le cadre de notre application.

Intéressons nous maintenant aux fréquences spatiales entrant en jeu dans le cadre de cette reconstruction et cherchons à comprendre l'origine de l'augmentation de résolution latérale et le gain en sectionnement optique obtenus en changeant la nature de l'illumination.

Lorsqu'un objet périodique de fréquence  $K_{obj}^{\vec{}}$  est illuminé par une onde plane de vecteur d'onde  $\vec{k}_i$ , on peut montrer que dans l'espace des fréquences spatiales,  $\vec{k}_d$  le vecteur d'onde de l'onde diffractée est donné par la loi de Bragg [135] :

$$\vec{k}_d = \vec{k}_i + \vec{K}_{objet}. \quad (4.1)$$

Un objet réel est une superposition d'objets périodiques. On aura donc une superposition d'ondes diffractées dont chaque direction est typique d'une fréquence de l'objet. La diffraction est un processus de diffusion élastique qui impose la condition :  $||k_i|| = ||k_d||$ . On peut ré-écrire l'équation (4.1) comme suit :

$$k^2 = (k_{ix} + K_{ox})^2 + (k_{iy} + K_{oy})^2 + (k_{iz} + K_{oz})^2 \quad . \quad (4.2)$$

L'équation (4.2) nous permet de voir que le lieu des points  $(K_{ox}, K_{oy}, K_{oz})$  accessibles est une sphère de rayon  $k_i$  et de centre  $(k_{ix}, k_{iy})$ . Cette sphère est appelée sphère d'Ewald [136]. On peut écrire l'équation de la sphère en considérant la composante  $K_{oz}$  et la représenter dans l'espace  $(K_{ox}/k_i; K_{oz}/k_i)$  (voir Figure 4.3) qui nous permettra de voir la forme du support dans cet espace fréquentiel :

$$\begin{cases} K_{oz} = -k_{iz} + \sqrt{k_{iz}^2 - (K_{ox}^2 + K_{oy}^2 + 2K_{ox}k_{ix} + 2K_{oy}k_{iy})} & (1) \\ K_{oz} = -k_{iz} - \sqrt{k_{iz}^2 - (K_{ox}^2 + K_{oy}^2 + 2K_{ox}k_{ix} + 2K_{oy}k_{iy})} & (2) \end{cases} \quad . \quad (4.3)$$

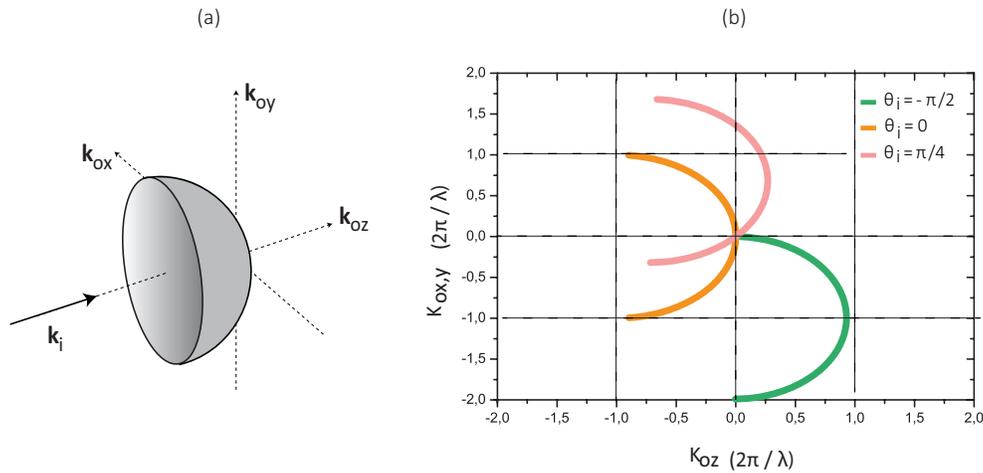


FIGURE 4.3 – (a) Représentation schématique du support fréquentiel pour un angle d'illumination  $\theta_{illumination}=0$ , (b) Coupe pour  $K_{oy}/k_i = 0$  des supports fréquentiels par  $K_{oz}/k_i$  pour des angles d'illumination valant  $\theta_{illumination} = -\pi/2; 0; \pi/4$  en fonction des valeurs de  $K_{ox}/k_i$ .

Pour une onde d'illumination de vecteur  $\vec{k}_i$ , on distinguera deux zones, une zone dans le sens des  $k_z$  positifs,  $z$  étant défini par l'axe du vecteur  $\vec{k}_i$ , qui représente la partie transmise de l'onde diffractée et une zone dans le sens des  $k_z$  négatifs qui représente la partie de l'onde réfléchie (cas où l'équation (4.3(2)) est vérifiée). Si on place le détecteur dans la zone des  $z$  positifs (mesure en transmission et cas où l'équation (4.3(1)) est vérifiée), on aura accès aux composantes transmises de l'onde qui décrivent une demi-sphère de rayon  $\|\vec{k}_i\|$ .

On peut relier les fréquences spatiales de l'onde diffractée et période spatiale de l'objet :  $\Delta = \frac{2\pi}{\|\vec{K}_{objet}\|}$  avec  $\Delta$  la taille typique des objets diffractés par la lumière et donc détectables sur un détecteur. On sait de plus que la résolution et le support fréquentiel sont liés : plus le support fréquentiel est grand, plus petite est la résolution.

La Figure 4.3 représente une coupe de cette demi-sphère. On voit que le support est en réalité une calotte sphérique. Pour une seule illumination, on ne collecte qu'un nombre très restreint de fréquences spatiales.

#### 4.2.1.1 Réponse fréquentielle d'un microscope

Dans un système optique, les rayons collectés sont sélectionnés par la pupille d'entrée de l'objectif. Dans le cas des objectifs de microscope les plus employés, cette pupille est virtuelle et même située à l'infini. Cela signifie que le diaphragme physique qui limite les rayons est situé au foyer image de l'objectif. On ne pourra jamais collecter l'intégralité de l'information diffractée au delà d'un cône limité à l'ouverture numérique de l'objectif, et ce de manière identique quelque soit la position de l'émetteur dans l'espace objet. On sait que l'ouverture numérique est liée à l'indice de réfraction du milieu d'immersion  $n_m$  et à l'angle maximal de collection  $\theta_{ill\ max}$  par la relation :  $ON = n \sin(\theta_{ill\ max})$ . L'ouverture numérique vient donc limiter la capacité de collection de la lumière diffractée par l'objet, comme le montre la Figure 4.4. La sphère ne sera pas reconstruite intégralement et par conséquent la collection des fréquences spatiales objets  $\vec{K}_o$  accessibles se trouve limitée.

Il existe différentes méthodes pour enrichir le support fréquentiel auquel on a accès. Une approche est de combiner les différents supports obtenus pour différentes illuminations obtenues avec des angles d'illumination différents. En effet, en considérant une illumination incohérente spatialement comme la somme incohérente d'illuminations cohérentes (voir Figure 4.4), les fréquences accessibles de l'objet sont la somme des portions de sphères accessibles avec chaque angle d'illumination élémentaire constituant la source incohérente. On peut voir que le support fréquentiel peut être doublé comparé à celui obtenu avec une illumination cohérente. (voir Figure 4.4(a)). Si l'on veut augmenter le pouvoir de résolution du système d'imagerie, il faut chercher à augmenter les fréquences spatiales collectées, ceci est à la base du principe des techniques de tomographie diffractive. En effet, grâce à un balayage angulaire de l'illumination ou à une rotation de l'échantillon, on va essayer d'augmenter les supports fréquentsiels.

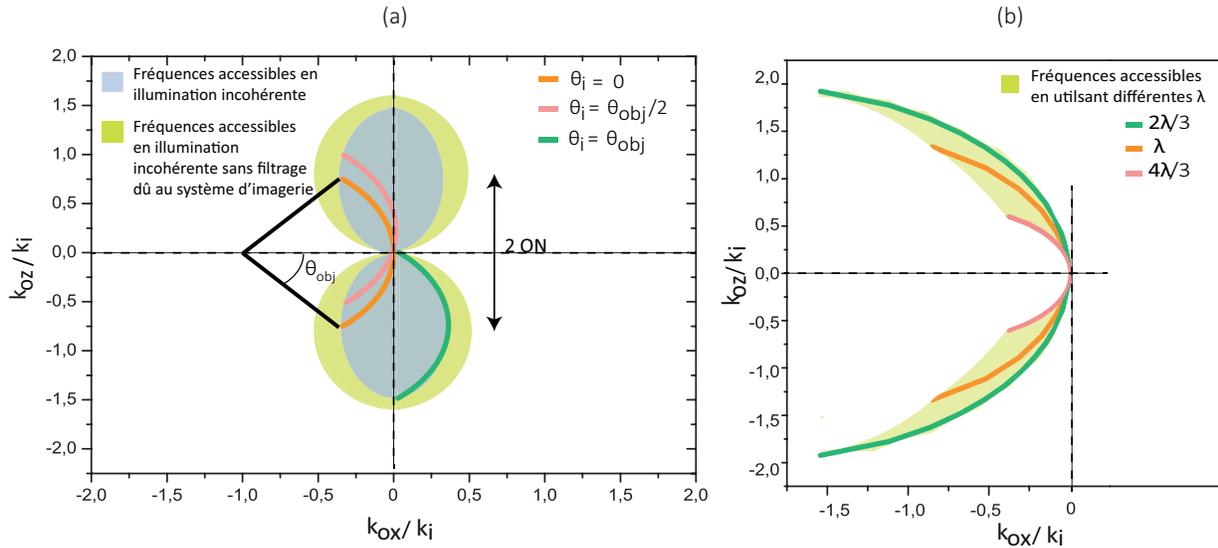


FIGURE 4.4 – (a) Représentation schématique du support fréquentiel pour un angle d’illumination  $\theta_{\text{illumination}}=0$ , (b) Coupe pour  $K_{oy}/k_i = 0$  des supports fréquentiels par  $K_{oz}/k_i$  pour des angles d’illumination valant  $\theta_{\text{illumination}} \in [-\pi/2; 0; \pi/4]$  en fonction des valeurs de  $K_{ox}/k_i$  et pour différentes valeurs de  $\lambda$ .

On peut également utiliser différentes longueurs d’ondes. Une variation de la longueur d’onde entraîne une variation du rayon de la sphère ainsi qu’un déplacement de son centre. Il est possible d’accéder à des fréquences objets supplémentaires mais de façon limitée. En effet, on constate en Figure 4.3(b) que le support fréquentiel total ne représente pas un aussi grand support qu’en utilisant différentes illuminations cohérentes (le support total sur les deux images est symbolisé par la zone colorée en vert). Il est donc plus intéressant d’utiliser une illumination incohérente plutôt que plusieurs illuminations à différentes longueurs d’ondes.

L’idée de la suite de ce travail est d’utiliser un éclairage incohérent spatialement afin de bénéficier de plus de résolution latérale et axiale. Cependant, on sait que l’utilisation d’un éclairage incohérent entraîne la perte de contraste pour certaines fréquences spatiales. Ce phénomène est bien connu en intensité, il l’est moins en phase. La raison principale est qu’il n’existait pas jusqu’à récemment d’appareils de mesure des champs  $\mathcal{EM}$  compatibles avec ces conditions d’illumination.

Intéressons-nous maintenant à la restitution fréquentielle d’un système d’imagerie afin de comprendre le gain en résolution et la perte de contraste associée.

La qualité de restitution de l’information contenue dans l’objet par le système d’imagerie est traduite dans l’espace des fréquences par une fonction appelée *fonction de transfert de modulation* (ou *FTM*). La FTM relie le contraste d’une image au contraste de l’objet

imagé en fonction des fréquences spatiales de celui-ci. Cette fonction est très utilisée en photographie notamment, lorsqu'il s'agit de caractériser les performances d'objectifs.

En fonction de l'illumination, la réponse du système est différente. Dans le cas d'une illumination cohérente, la FTM est une fonction porte (voir Figure 4.5). Dans le cas d'une illumination incohérente, la fonction est différente et on observe une chute de contraste par rapport à l'utilisation d'une illumination cohérente décrite par Wolf [135] (voir Figure 4.5). L'intensité lumineuse diffractée par un objet dépend de la quantité de lumière de la source  $S$  qui se diffracte sur le nombre d'illuminations telles que la somme  $\vec{k}_i + \vec{K}_o \in S(\vec{k})$ . On voit qu'au centre du support fréquentiel, appelé communément *cacahuète des fréquences* (voir Figure 4.4), le nombre de possibilités est beaucoup plus grand qu'au bord, d'où une perte d'intensité relative entre les fréquences spatiales. On illustre cette FTM en intensité pour trois degrés de cohérence de l'illumination en Figure 4.5. Le degré de cohérence de l'illumination représente le ratio  $ON_{illumination}/ON_{collection}$  et varie entre 0 (cas d'une illumination totalement cohérente) à 1 (cas d'une illumination totalement incohérente). On voit que pour une illumination cohérente, le contraste vaut 1 jusqu'à une fréquence de coupure  $\lambda/ON$ . Pour une illumination incohérente, on constate que la fréquence de coupure est plus grande et égale à  $2\lambda/ON$ , on a par conséquent accès à des fréquences spatiales plus élevées et donc à des détails plus fins de l'image. Cependant, dans cette configuration, le contraste chute rapidement et ce, pour toutes les fréquences spatiales.

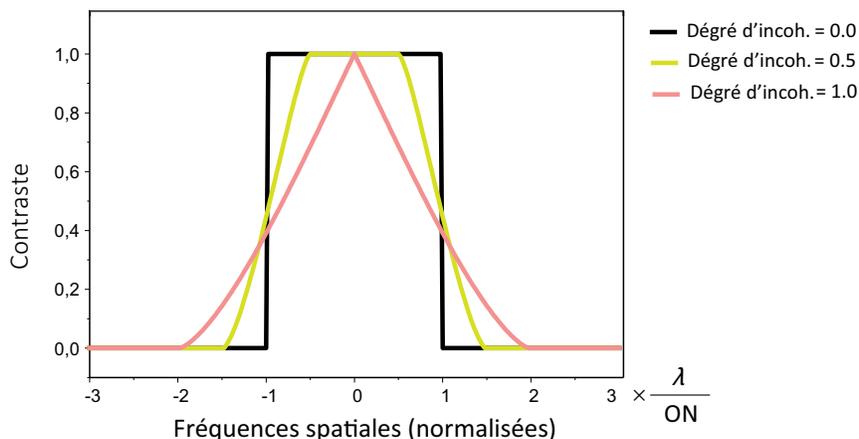


FIGURE 4.5 – Représentation schématique du contraste en intensité en fonction des fréquences spatiales pour trois degrés de cohérence de l'illumination différents.

On représente l'effet du filtrage et de l'incohérence spatiale de l'illumination sur l'imagerie d'une mire radiale (voir Figure 4.6). Cet objet est utilisé de façon classique pour mesurer les FTM de systèmes d'imagerie et est composé d'un grand nombre de fréquences spatiales avec une intensité variant sinusoidalement. Cet objet est défini par l'équation suivante :  $\Delta n(r, \phi) = \Delta n_0 \cos(\phi N)$ , avec  $(r, \phi)$  les coordonnées polaires,  $\Delta n_0$  la valeur complexe de l'indice de réfraction, que l'on prendra ici imaginaire pur afin d'avoir un objet d'intensité et  $N$  une constante permettant de créer un objet avec des périodes différentes.

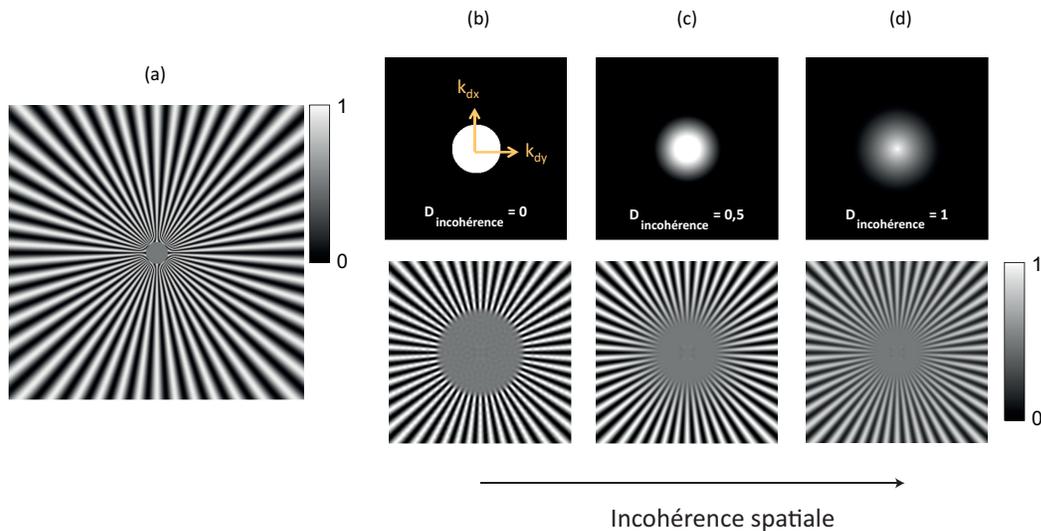


FIGURE 4.6 – Résultats de la simulation du filtrage par le microscope d’un objet d’intensité avec des illuminations de différents degrés de cohérence spatiale. (a) Représentation de l’objet d’intensité variant de façon sinusoïdale et radiale, d’amplitude de modulation 1. Visualisation des FTM d’intensité et des images filtrées correspondantes pour 3 degrés de cohérence spatiale (0 (b) ; 0,5 (c) et 1 (d)).

On suppose que la source émet de façon isotrope dans une gamme angulaire d’ouverture numérique  $ON$ , on suppose également que le contraste vaut 1 dans le cas où les angles d’illumination sont compris dans l’ouverture numérique de l’objectif et 0 sinon. Trois images de cet objet ont été simulées pour des degrés d’incohérence différents. Les images en configuration où le degré de cohérence vaut 0 disposent de fréquences spatiales plus élevées. Lorsque le degré d’incohérence augmente, des détails parmi les plus fins au centre de l’image correspondant aux fréquences spatiales les plus élevées sont reconstruits. Cependant, ce gain en résolution s’accompagne d’une perte de contraste pour les fréquences spatiales intermédiaires entre la fréquence spatiale nulle et les plus élevées, ce qui est visible sur la Figure 4.6(d).

## 4.2.2 La tomographie diffractive

### 4.2.2.1 Principe de la méthode de tomographie diffractive

La première étape pour reconstruire une distribution d’indice de l’objet grâce à la technique de tomographie diffractive consiste à mesurer  $\vec{k}_d$ . Connaissant  $\vec{k}_i$ , on peut en déduire les fréquences spatiales de l’objet diffractant.

Les composantes spatiales de la lumière diffractée par un objet dépendent des fréquences spatiales de cet objet mais également de sa direction de propagation par rapport à l’axe

optique du système d'imagerie ainsi que de sa longueur d'onde.

Pour une illumination cohérente, les fréquences spatiales de l'objet sont portées par une portion de sphère (ou calotte) dans l'espace des fréquences. L'information concernant l'objet est partielle comme on peut le voir en Figure 4.3 avec un support fréquentiel lacunaire et est de plus filtrée par le système d'imagerie (voir Figure 4.4).

Afin de récupérer le plus d'information possible sur l'objet afin de le reconstruire via un système d'imagerie, il convient d'augmenter le support de l'information. On a vu qu'il était possible de faire cela en utilisant une illumination incohérente. En effet, on arrive à récupérer des fréquences jusqu'à deux fois plus élevées correspondant aux détails les plus fins de l'image. La résolution latérale est ainsi augmentée. De même, le support fréquentiel suivant l'axe optique est augmenté créant un phénomène de sectionnement optique conséquence d'un accroissement de résolution suivant cette dimension.

#### 4.2.2.2 Etablissement de l'expression du champ diffracté en tomographie diffractive

On considère une onde plane monochromatique se propageant selon le vecteur  $\vec{k}$ . Après son interaction avec un objet semi-transparent, on peut décomposer le champ mesuré  $\vec{u}(\vec{r})$  en le champ incident  $\vec{u}_i(\vec{r})$  et un champ diffracté  $\vec{u}_d(\vec{r})$  :

$$\vec{u}(\vec{r}) = \vec{u}_d(\vec{r}) + \vec{u}_i(\vec{r}). \quad (4.4)$$

Dans la suite du manuscrit, les indices "i" et "d" seront respectivement attribués aux grandeurs incidentes et diffractées.

La propagation de  $\vec{u}(\vec{r})$  au sein du milieu est décrite par l'équation de propagation dans l'échantillon [136] :

$$\nabla^2(\vec{u}(\vec{r})) + (k^2 n^2(\vec{r})) \vec{u}(\vec{r}) = 0. \quad (4.5)$$

avec  $n(\vec{r})$  la distribution d'indice complexe au sein du milieu et  $\nabla$  l'opérateur gradient.

Le champ incident  $\vec{u}_i(\vec{r})$  satisfait également à l'équation d'onde dans le milieu avec l'échantillon (équation 4.5), comme suit :

$$\nabla^2(\vec{u}_i(\vec{r})) + (k^2 n_m^2) \vec{u}_i(\vec{r}) = 0. \quad (4.6)$$

avec  $k$ , le vecteur d'onde qui vaut  $2\pi/\lambda$  et  $n_m$  l'indice de réfraction du milieu externe. Cette relation est valable en tout point de l'espace.

A l'aide des relations (4.4) & (4.6), on peut écrire la relation suivante :

$$\nabla^2(\vec{u}(\vec{r}) - \vec{u}_d(\vec{r})) + (k^2 n_m^2)(\vec{u}(\vec{r}) - \vec{u}_d(\vec{r})) = 0. \quad (4.7)$$

En fin, grâce aux relations (4.5) & (4.6), on peut écrire :

$$(\nabla^2 + k^2 n_m^2) \vec{u}_d(\vec{r}) = (-k^2 n^2 + k^2 n_m^2) \vec{u}(\vec{r}) \quad (4.8)$$

et obtenir l'expression finale en supposant l'objet peu diffractant (*i.e.*  $\vec{u}_d(\vec{r}) \ll \vec{u}_i(\vec{r})$ ) :

$$(\nabla^2 + k^2 n_m^2) \vec{u}_d(\vec{r}) = \underbrace{-k^2 n_m^2 \left[ \left( \frac{n(\vec{r})}{n_m} \right)^2 - 1 \right]}_{F(\vec{r})} \vec{u}(\vec{r}) \quad (4.9)$$

Il n'existe pas de méthode générale pour résoudre l'équation différentielle pour  $\vec{u}_d(\vec{r})$ . Cependant, on peut trouver une solution particulière dans le cas d'une inhomogénéité particulière  $\delta(r - r')$  en utilisant une fonction de Green d'équation [137] :

$$g(r|r') = \frac{1}{4\pi R} \exp(ikR) \quad (4.10)$$

où  $R = ||\mathbf{r} - \mathbf{r}'||$ .

L'approximation paraxiale donne ici une relation linéaire entre la fonction objet  $F(\vec{r})$  et le champ  $\vec{u}_d(\vec{r})$ . En prenant la transformée de Fourier de chaque partie de l'équation 4.9, on obtient la relation suivante [138] :

$$\tilde{F}(K_x, K_y, K_z) = \frac{ik_{dz}}{\pi} \tilde{u}_d(k_x, k_y, z = 0) \quad (4.11)$$

où  $\tilde{X}$  représente la transformée de Fourier de la fonction  $X$ ,  $F(\vec{r})$  est une fonction appelée fonction objet et  $k_{dz}$  la composante suivant  $z$  du vecteur d'onde du champ diffracté, les fréquences  $K$  sont les fréquences dans le plan objet et  $k$  sont les fréquences dans le plan image. On détaillera par la suite ce que représente la composante  $k_{dz}$ . La fonction objet représente la dérivée du champ  $\vec{u}(\vec{r})$  selon  $z$ .

Pour les échantillons biologiques, il est d'usage d'utiliser l'approximation de Rytov qui ne fait pas d'hypothèse sur la taille de l'échantillon ou le déphasage total mais sur le gradient de l'indice de réfraction. Avec cette approximation, le champ devient :

$$\vec{u}_{Rytov}(\vec{r}) = \vec{u}_i(\vec{r}) \ln \left( \frac{\vec{u}(\vec{r})}{\vec{u}_i(\vec{r})} \right) \quad (4.12)$$

### 4.2.2.3 Adaptation des outils de tomographie diffractive

La principale adaptation d'une relation utilisée en tomographie diffractive intervient au niveau de l'équation (4.11). On a dit précédemment que l'on souhaitait utiliser la capacité de notre technique à travailler dans des conditions d'illumination spatialement incohérente. Dans le cas où plusieurs illuminations obliques sont envoyées en même temps sur l'échantillon, les différents champs diffractés vont participer à la création dans l'espace de Fourier d'une portion de sphère caractéristique de l'illumination incidente. Un point de l'espace de Fourier peut appartenir à différentes portions de sphère et par conséquent, on décide de moyennner les composantes  $k_d$  sur les différentes illuminations incidentes  $\theta_{ill}$ . L'équation (4.11) devient :

$$\tilde{F}(\vec{r}) = \frac{i < k_{dz} >_{\theta_{ill}}}{\pi} \tilde{u}_d(\vec{r}) \quad (4.13)$$

Le champ qui sera mesuré dans notre cas est donc :

$$\vec{u}_{Rytov}(\vec{r}) = \vec{u}_i(\vec{r}) \ln \left( u_{Rytov}(\vec{r}) \right) \quad (4.14)$$

C'est ce champ  $\vec{u}_{Rytov}(\vec{r})$  qui sera mesuré avec l'analyseur de front d'onde.

On se propose maintenant d'étudier l'influence de l'illumination spatialement incohérente sur la formation et l'analyse d'un interférogramme. On étudiera également l'effet de l'illumination incohérente et de la chute de contraste pour les fréquences les plus élevées de l'image sur le côté quantitatif de la mesure. On déterminera grâce à des simulations la fonction de transfert de modulation de l'intensité et de la différence de chemin optique de notre système en fonction des optiques utilisées et de l'analyseur de front d'onde. En effet, le détecteur utilisé doit être pris en compte dans le calcul de cette FTM puisqu'un filtrage de certaines fréquences est possible dans certains cas en fonction de la taille des pixels utilisés ou de la présence d'un composant comme le réseau de diffraction.

### 4.2.3 Formation des images de phase quantitative par ID4L dans des conditions d'illumination incohérente

#### 4.2.3.1 Équation des interférogrammes obtenus

Un point de la source constitue un angle d'illumination. Pour une même fréquence spatiale objet, un nombre différent d'angles d'illumination, de points de la source vont se diffracter. Dans le cas de la mesure de phase, il faut tenir compte de la fonction de d'instrument de l'analyseur. Pour cela, il faut étudier le comportement de l'analyseur en éclairage incohérent.

Dans un premier temps, on se propose d'étudier l'interférogramme obtenu sous la condition d'illumination incohérente spatialement. L'illumination incohérente est considérée dans la suite comme la superposition incohérente d'ondes planes et on suppose que chaque surface d'onde élémentaire est basculée d'un angle lié à l'orientation du vecteur d'onde d'illumination  $\vec{k}$  au niveau du plan du détecteur. L'onde électromagnétique de surface d'onde OPD décrite par l'équation (1.11) de la partie 1.2.4.3 peut être réécrite :

$$E(\theta_{\text{ill image}}, x) = a(\theta_{\text{ill image}}, x) \exp(ikOPD(\theta_{\text{ill image}}, x)) \exp(2i\pi\tau(\theta_{\text{ill image}}, x)) \quad (4.15)$$

avec  $\tau$  la composante en tilt du front d'onde valant  $\tan(\theta_{\text{ill image}}) x$  en tenant compte de la nature oblique de l'illumination.

Dans un régime d'illumination incohérente, les différents champs électromagnétiques issus de tous les points sources de la lampe halogène ne pourront pas interférer en raison du caractère incohérent de leur émission. On pourra de ce fait sommer les intensités arrivant au détecteur et considérer que l'interférogramme obtenu est le résultat de la somme de tous les interférogrammes créés par chacun des points sources.

$$I_{\text{total}} = \int_0^{\theta_{\text{ill max}}} I(\theta_{\text{ill}}, x, z) \cdot d\vec{\theta}_{\text{ill}}. \quad (4.16)$$

Chaque interférogamme est décalé latéralement au niveau du détecteur. On peut relier tilt et angle d'illumination dans l'espace image du microscope, en utilisant le grandissement  $\gamma$ , par la relation suivante :

$$\tau(\theta_{\text{ill}}) = \frac{\tan(\theta_{\text{ill}})}{\gamma}. \quad (4.17)$$

On comprend l'intérêt d'éviter que chaque interférogamme ne soit "trop" décalé par rapport aux autres à cause du tilt introduit par l'illumination oblique pour éviter qu'un brouillage de franges n'empêche la mesure.

Dans le cas où la cohérence de l'illumination est déterminée par l'ouverture du diaphragme d'ouverture du microscope, il a été montré [41] que l'angle maximum d'illumination dans le plan objet du microscope est relié au grandissement de l'objectif utilisé ainsi qu'à l'angle maximum d'illumination dans le plan image du microscope (*i.e.* plan du détecteur). On peut donc écrire :

$$\tan(\theta_{\text{ill image}}) = \frac{\tan(\theta_{\text{ill objet}})}{\gamma} \quad (4.18)$$

avec  $\gamma$  grandissement du système optique.

Le grandissement supérieur à 1 du microscope permet de réduire l'étendue géométrique de la source au niveau de son plan image et par conséquent au niveau du détecteur. On verra dans la suite l'importance du grandissement pour conserver un contraste permettant de réaliser une mesure d'OPD.

De même qu'on l'a fait dans le chapitre 3 dans le cas d'une lumière polarisée, on établit cette fois l'équation de l'interférogamme obtenu à une dimension dans le cadre d'une illumination spatialement incohérente afin de comprendre la formation des images. On utilisant les équations (1.11) établie dans la partie 1.2.4.3 et (4.15) établissant l'expression du champ électromagnétique, on peut écrire :

$$I_{\text{ill}} = I_0 + I_{(\theta_{\text{ill}}, x, z)} \left[ \cos \left( \frac{2\pi}{p} \left( x - z_p \frac{\partial \text{OPD}(\theta_{\text{ill}}, x, z)}{\partial x} \right) - z_p \tau(\theta_{\text{ill}}) \right) \right] \quad (4.19)$$

On considère le fait que l'épaisseur de l'objet imagé varie en fonction de l'angle entre l'illumination et l'axe optique du système [43] (voir Figure 4.7). On redéfinit l'expression de l'OPD (équation 2.1) établie dans la partie 2.2 lorsqu'elle est mesurée dans des conditions d'illumination spatialement incohérente avec une épaisseur d'objet locale variant en fonction de l'illumination :

$$\text{OPD}(\theta_{\text{ill}}) = \int_0^e (n(x, y, z) - n_{\text{milieu}}(x, y, z)) \cdot \frac{dz}{\cos(\theta_{\text{ill}})}. \quad (4.20)$$

avec  $\theta_{\text{ill}}$  l'angle que fait l'illumination par rapport à l'axe optique du système,  $n(x, y, z)$  et  $n_{\text{milieu}}$  les indices de réfraction locaux de l'échantillon et du milieu environnant et  $e$  l'épaisseur physique le long de l'axe optique.

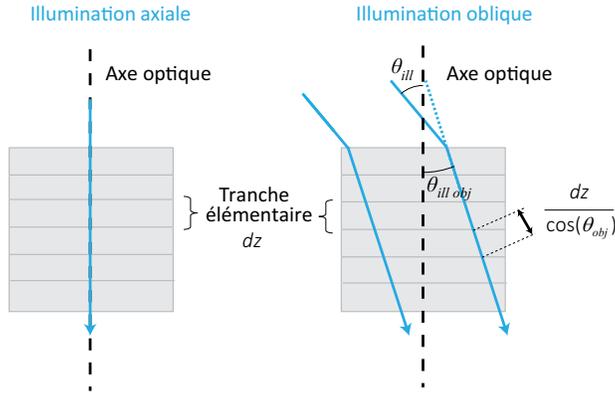


FIGURE 4.7 – Illustration de l'augmentation d'épaisseur de la tranche  $dz$  dans le cas d'une illumination oblique.

#### 4.2.3.2 Influence du grandissement sur le contraste de l'interférogramme mesuré

On a établi partie 1.14 du chapitre 1 que l'équation régissant la formation de l'interférogramme s'écrivait de la façon suivante :

$$I(x, y) = I_0 \left[ \begin{array}{l} 1 + \cos\left(\frac{2\pi}{pas}\left(x - z_p \frac{\partial W}{\partial x}\right)\right) + \cos\left(\frac{2\pi}{pas}\left(y - z_p \frac{\partial W}{\partial y}\right)\right) \\ + \frac{1}{2} \cos\left(\frac{2\pi}{pas}\left((x + y) - z_p \frac{\partial W}{\partial(x + y)}\right)\right) \\ + \frac{1}{2} \cos\left(\frac{2\pi}{pas}\left((x - y) - z_p \frac{\partial W}{\partial(x - y)}\right)\right) \end{array} \right] \quad (4.21)$$

On a montré [41], qu'en un point élémentaire de l'illumination par une onde plane avec  $W$  constante, on peut écrire en notant  $K$  le rapport  $\frac{2\pi}{pas}$  :

$$I(x, y) = I_0 \left[ \begin{array}{l} 1 + \left[ \cos(Kx) + \cos(Ky) \right] \\ + \frac{1}{2} \left[ \cos\left(\sqrt{2}K \frac{(x + y)}{\sqrt{2}}\right) + \cos\left(\sqrt{2}K \frac{(x - y)}{\sqrt{2}}\right) \right] \end{array} \right]. \quad (4.22)$$

Dans le cas d'une source circulaire de rayon  $R$  tel que  $R = z_p \frac{\tan(\theta_{illmax})}{\gamma}$ , la relation précédente se généralise :

$$I(x, y) = I_0 \left[ \begin{array}{l} 1 + M(KR) \left[ \cos(Kx) + \cos(Ky) \right] \\ + \frac{1}{2} M(\sqrt{2}KR) \left[ \cos(K(x + y)) + \cos(K(x - y)) \right] \end{array} \right], \quad (4.23)$$

avec  $M(X) = 2 \frac{J_1(X)}{X}$ ,  $J_1(X)$  étant la fonction de Bessel d'ordre 1.

On voit que la modulation de l'intensité, porteuse de l'information sur le gradient de la phase, dépend de l'angle d'illumination et du grandissement utilisé. On calcule les fonctions contraste (défini équation (4.24)) et la visibilité des franges dans le cas d'une illumination incohérente spatialement afin de définir le point de fonctionnement optimal de la méthode.

$$C = \frac{\max [I(x, y)] - \min [I(x, y)]}{\max [I(x, y)] + \min [I(x, y)]} \quad (4.24)$$

$$\text{et } \text{Visibilité}(\theta_{illmax}) = \frac{|M(\theta_{illmax})|}{I_0/I_{max}} \quad (4.25)$$

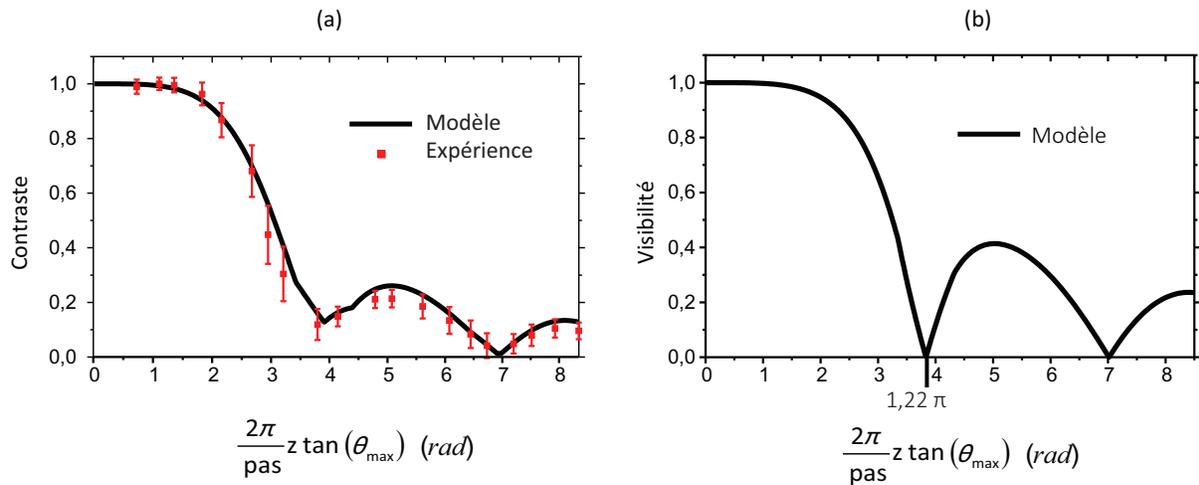


FIGURE 4.8 – Contraste de l'interférogramme en fonction de la cohérence de l'illumination. (a) En noir plein : fonction de contraste théorique calculée à partir de l'équation 4.22. En carrés rouges : Mesures effectuées avec l'analyseur de front d'onde placé dans le plan image du microscope. (b) Visibilité des franges en fonction de l'étendue de la source au niveau du détecteur.

La Figure 4.8(a) présente les variations du contraste et la Figure 4.8(b) présente celles de la visibilité des franges en fonction du degré d'incohérence de l'illumination. La visibilité décrit la modulation avec l'étendue de la source au niveau du détecteur. On voit que cette grandeur ne dépend que des paramètres  $z_p$ , du pas du réseau, de l'ouverture numérique d'illumination et du grandissement. Les paramètres de l'analyseur étant fixés, pour un paramètre d'illumination donné, on peut jouer sur le grandissement du système afin d'adapter le contraste des franges de l'interférogramme.

En considérant une illumination totalement incohérente spatialement et en utilisant un objectif de faible grandissement, le contraste et le rapport signal sur bruit de la mesure seront faibles. En augmentant le grandissement total du microscope, il est possible

de regagner du contraste puisque l'étendue géométrique au niveau du détecteur est inversement proportionnelle au grandissement (voir équation 4.18). Avec un grandissement total de  $100\times$ , la visibilité vaut 0,98. La mesure est faite dans des conditions optimales de contraste alors même que l'illumination est totalement incohérente.

Nous venons de voir que le contraste de l'interférogramme et de l'information utile pour la reconstruction de la phase sont directement liés à l'étendue géométrique de la source au niveau du détecteur. On peut cependant tout de même se placer en illumination totalement incohérente en utilisant des grandissements élevés pour réduire l'étendue angulaire de la source dans le plan image. Par exemple, pour travailler avec une ouverture numérique de collection et d'illumination de 1,3, le grandissement minimum sera de 207 fois, ce qui est facilement réalisable techniquement en utilisant un système de ré-imagerie.

Cependant, même pour une visibilité égale à 0,98, le contraste de l'information contenue est faible.

#### 4.2.4 Influence de la cohérence spatiale de l'illumination sur la mesure de l'OPD

Un second effet de l'incohérence de l'illumination est la chute de contraste pour les fréquences spatiales les plus hautes et qui se traduit par une diminution de la valeur d'OPD. A titre d'exemple, on présente en Figure 4.9 les résultats de l'imagerie d'une bille de polystyrène de  $5\mu\text{m}$  d'épaisseur en éclairage cohérent et incohérent spatialement.

L'éclairage cohérent est réalisé avec un condenseur à air (Nikon,  $\text{ON}_{\text{illumination}}=0,52$ ) avec un diaphragme d'ouverture fermé à son maximum ( $\text{ON}_{\text{illumination}} = 0,08$ ). L'éclairage incohérent est réalisé avec un condenseur à immersion (Nikon,  $\text{ON}_{\text{illumination}}=1,4$ ) avec un diaphragme d'ouverture réglé de façon à remplir la pupille de l'objectif (Nikon,  $100\times$  à immersion,  $\text{ON}_{\text{collection}}=1,3$ ) pour considérer que  $\text{ON}_{\text{illumination}} = \text{ON}_{\text{collection}}$ . Le contraste moyen des franges en illumination cohérente est de 0,88 et de 0,85 pour l'illumination incohérente, ce qui est équivalent. On confirme par cette mesure qu'il est possible de conserver un contraste équivalent à celui obtenu en utilisant un éclairage spatialement cohérent en augmentant le grandissement du système d'imagerie.

On voit cependant que, bien qu'il soit contrasté, l'interférogramme obtenu en éclairage incohérent ne permet pas de trouver la même valeur d'OPD que dans le cas cohérent avec une réduction de la valeur de près de moitié. Il apparaît nécessaire de compenser cette chute de contraste afin de récupérer une valeur quantitative correcte de la mesure. Pour cela, un calcul de la FTM du système optique via une simulation numérique par *POC* est réalisée afin de pouvoir déterminer la chute de contraste en fonction des fréquences spatiales de l'objet. Ce calcul est développé plus en détail dans l'article [139] placé en [Annexe C](#) et ne sera pas traité ici. On utilisera uniquement les résultats de ce calcul en exploitant cette FTM pour déconvoluer des images.

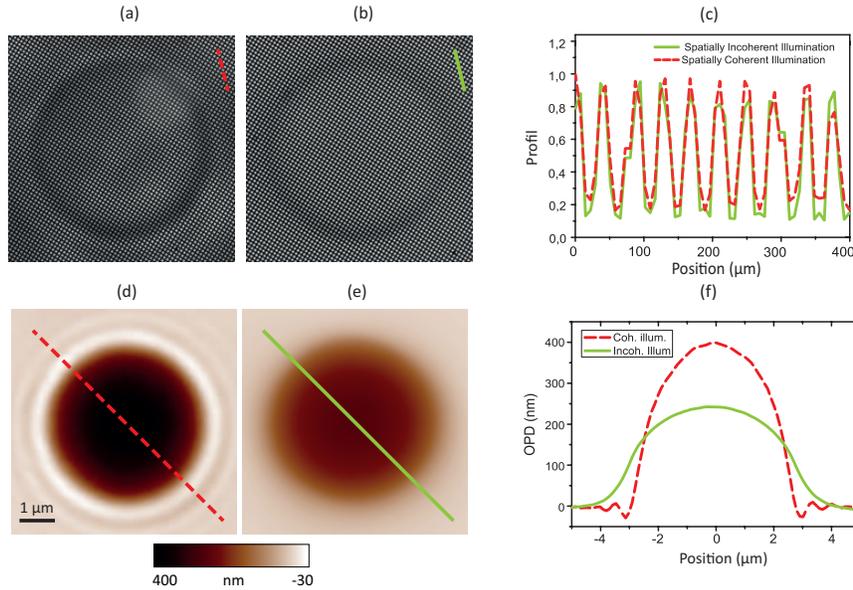


FIGURE 4.9 – Imagerie d’une bille de polystyrène ( $n=1,581$  à  $\lambda=700$  nm) immergée dans un milieu d’indice mesuré à  $1,556$ . (a) interférogramme obtenu avec une illumination cohérente, (b) interférogramme obtenu avec une illumination incohérente, (c) profils réalisés sur les interférogrammes présentés en (a) en rouge et (b) en vert, (d) et (e) images d’OPD calculées respectivement à partir des interférogramme (a) et (b), (f) profils réalisés sur les images d’OPD (d) et (e). Observation à un grandissement de  $250\times$ .

## 4.2.5 Réponse fréquentielle de l’imagerie de phase incohérente

### 4.2.5.1 Utilisation de la Fonction de Transfert de Modulation du système

La validité de la simulation par *POC* a déjà été présentée dans le cadre d’une illumination cohérente spatialement dans le chapitre 2. On se propose maintenant de vérifier la validité de cet outil de simulation dans le cas d’une illumination oblique. Pour cela, on compare des mesures expérimentales à la simulation pour une bille de polystyrène de  $5\ \mu\text{m}$  de diamètre placée dans un milieu d’indice déterminé par réfractométrie dans le cadre d’illuminations spatialement cohérente et incohérente.

Les résultats sont présentés Figure 4.10. On peut voir que la simulation correspond parfaitement à la réalisation expérimentale dans les deux cas. Les profils tracés sur les différentes Figures 4.10(a) et (b) permettent de comparer expérience et simulation en terme de valeur d’OPD. On peut constater que la chute de valeur quantitative est correctement décrite par la simulation lorsque l’on modifie la cohérence de l’éclairage. On voit que la simulation est en accord avec le résultat expérimental, la chute de valeur quantitative est correctement décrite par la simulation ce qui atteste de la validité de cet outil de simulation quant à l’utilisation d’un éclairage incohérent.

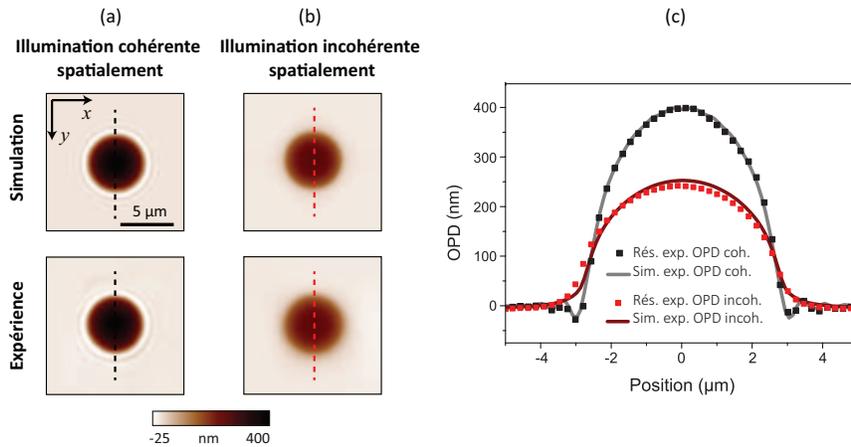


FIGURE 4.10 – (a) images d’OPD sous illumination cohérente d’une bille de polystyrène de 5  $\mu\text{m}$  de diamètre immergée dans un milieu d’indice  $n_{med} = 1,542$ . Haut : simulation et bas : expérience. (b) Images d’OPD sou illumination incohérente du même échantillon que pour les images (a). (c) Profils réalisés sur les différentes images d’OPD (Carrés noirs : points expérimentaux sous illumination cohérente (a, bas). Trait plein gris : résultat de la simulation (a, haut), carrés rouges : points expérimentaux sous illumination incohérente (b,bas). Trait bordeaux : résultat de la simulation (b, haut)).

#### 4.2.6 Images d’objets bidimensionnels

On a vu que l’on pouvait utiliser l’approximation projective pour réaliser des mesures sous la réserve d’objets fins ou peu déphasants (voir partie 2.2 du Chapitre 2). On considère un objet déphasant et bidimensionnel dont on cherche à mesurer le déphasage. L’interprétation de la mesure ne sera réalisée que dans le plan de mise au point de l’objet. L’intérêt de cette opération est de bénéficier de l’augmentation de résolution apportée par l’illumination incohérente en regagnant du contraste. Pour cela, on utilise la FTM du système {microscope + analyseur de front d’onde} déterminée dans le cadre de cette approximation (voir article [139] en annexe). Les résultats des simulations sont présentées en Figure 4.11.

La Figure 4.11 montre les FTM mesurées dans les 2 conditions d’incohérence. La FTM théorique est illustrée en traits pointillés gris tandis que les FTM d’OPD et d’intensité sont respectivement représentées en trait plein noir et rouge.

Pour  $ON_{illumination}=1$  et  $ON_{collection}=1,3$ , la variation du contraste des FTM d’OPD et d’intensité suivent celles de la FTM théorique même si la chute de contraste apparaît pour des fréquences spatiales plus faibles.

Les FTM d’intensité et plus particulièrement la FTM d’OPD s’éloignent plus de la FTM théorique quand le degré d’incohérence augmente. La chute de contraste est donc plus grande à forte incohérence spatiale.

Il est important de noter que pour chaque association objectif/condenseur, la FTM en régime projectif dépendant fortement des ouvertures numériques utilisées, il faudra recalculer

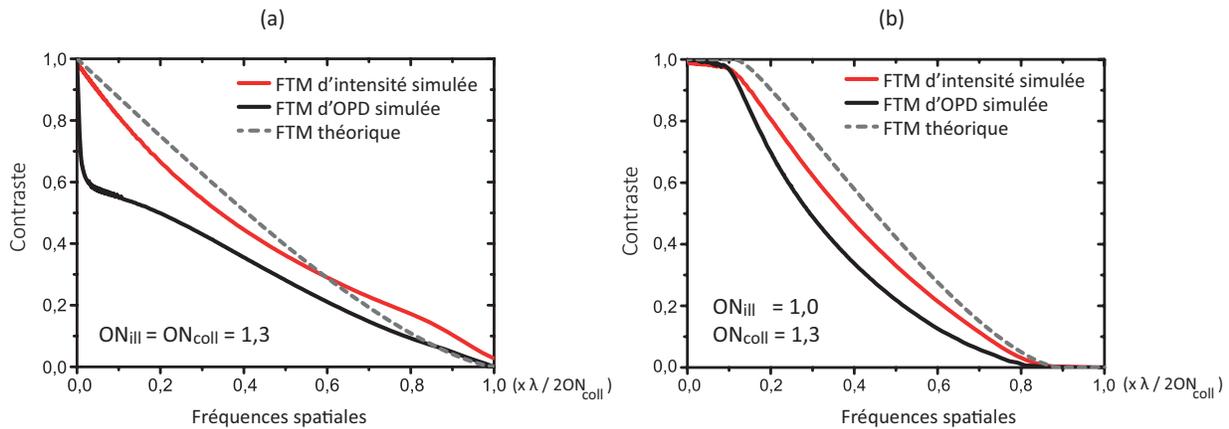


FIGURE 4.11 – Représentation des FTM simulées et théorique pour (a)  $ON_{illumination} = ON_{collection} = 1,3$  et (b)  $ON_{illumination} = 1$  et  $ON_{collection} = 1,3$  en fonction des fréquences spatiales.

la FTM d’OPD et d’intensité. Il est intéressant de noter que le contraste en OPD chute fortement quand on passe d’une ouverture numérique d’illumination de 1 à 1,3. Dans le cas où la résolution obtenue avec une ouverture d’illumination égale à 1 est suffisante, il est préférable de privilégier cette configuration expérimentale afin d’avoir une compensation plus faible pour certaines fréquences.

#### 4.2.7 Images d’objets tridimensionnels

La FTM en 2D calculée précédemment n’est valide que dans le cadre d’objets 2D et dans le plan de mise au point. Dans le cadre d’objets épais, dès que la dimension axiale de l’objet est supérieure à la profondeur de champ du système, il est nécessaire de calculer cette fonction en 3D. En effet, dans le cas d’un échantillon épais, les plans adjacents au plan imagé vont avoir une influence sur la mesure effectuée dans le plan de mise au point. La FTM d’OPD et d’intensité sont calculées. Les résultats sont présentés en Figure 4.12. On trace différentes coupes au niveau de la FTM d’OPD (Figure 4.12 (d) et (e)) et on représente ses variations en fonction des fréquences spatiales. On voit que les FTM sont différentes de la FTM théorique représentée Figure 4.11. On compare le champ électromagnétique obtenu pour une illumination incohérente en OPD et intensité. On reconnaît la forme caractéristique attendue théoriquement de papillon des fréquences avec plusieurs lobes. On observe néanmoins une lacune pour certaines fréquences (zone noire visible au centre des lobes) au sein de la structure. Cette lacune est observée sur les images de simulation et au niveau des résultats expérimentaux obtenus avec notre méthode ce qui nous fait dire qu’elle est due au détecteur. Nous n’avons pas d’explication plus complète pour le moment sur la cause de cette lacune. Sa conséquence directe est l’apparition d’artefacts de reconstruction sur les images d’OPD comme on le verra par la suite.

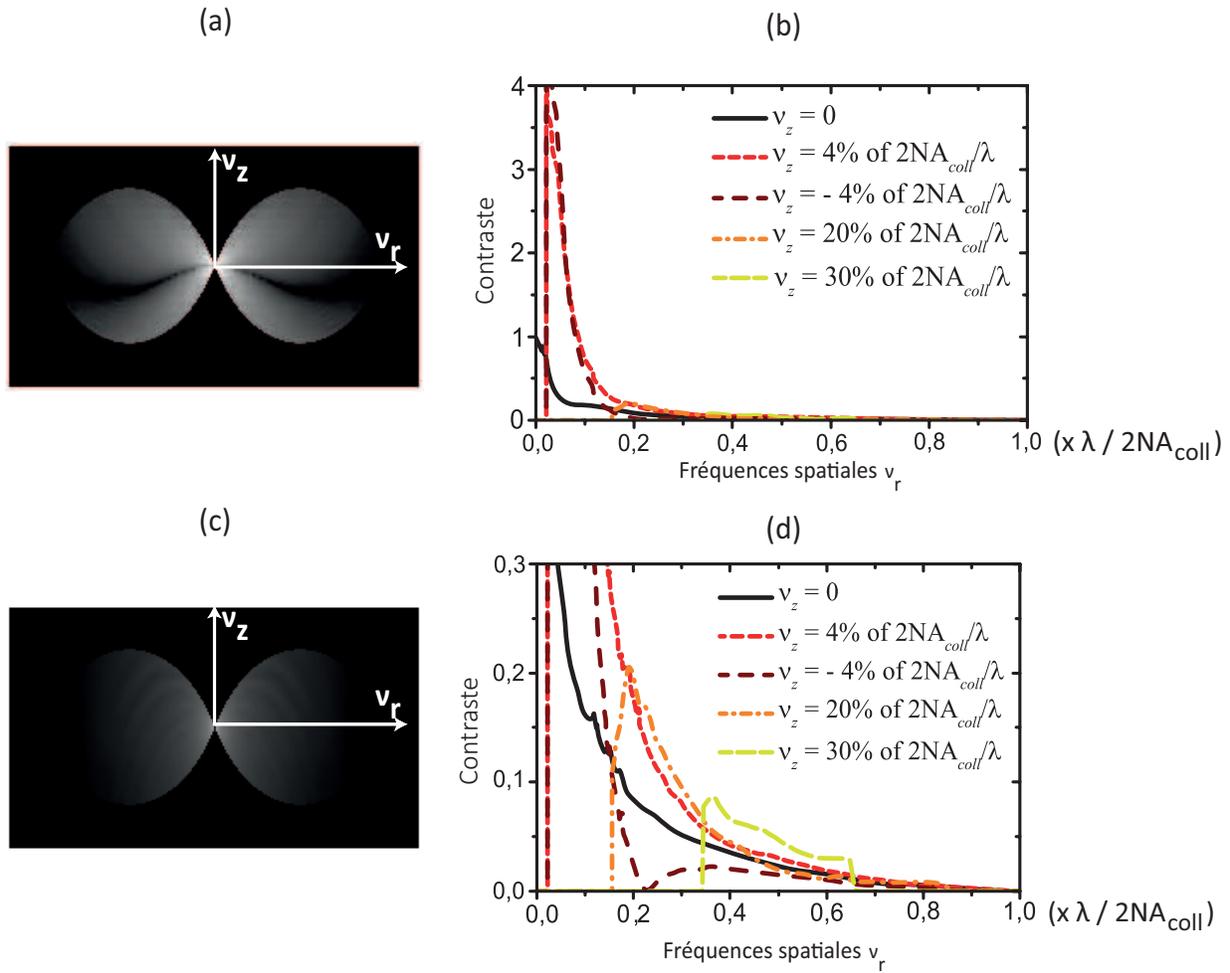


FIGURE 4.12 – FTM 3D visualisée dans le plan  $(\nu_r, \nu_z)$  (en échelle logarithmique) avec  $ON_{collection} = ON_{illumination} = 1,3$ . (b) OPD et (c) Intensité. (d) Représentation de la modulation d’amplitude en fonction des fréquences latérales  $\nu_r$  normalisées grâce à des profils tracés sur (c) correspondant à  $\nu_z=0$  (trait noir),  $\nu_z= 4\%$  de  $2ON_{collection}/\lambda$  (trait pointillé rouge),  $\nu_z= -4\%$  de  $2ON_{collection}/\lambda$ ,  $\nu_z$  (trait pointillé marron),  $\nu_z= 20\%$  de  $2ON_{collection}/\lambda$  (trait pointillé orange) et  $\nu_z= 30\%$  de  $2ON_{collection}/\lambda$  (trait pointillé vert). (d) Zoom de la courbe (c).

#### 4.2.7.1 Déconvolution d’images

La convolution est un outil mathématique qui permet de formaliser l’effet d’un filtrage. On a évoqué le filtrage de certaines fréquences de l’objet par le système optique via une fonction de transfert optique. Il existe différentes techniques numériques qui permettent de déconvoluer des images, c’est-à-dire d’inverser les effets de la convolution afin d’augmenter la résolution des images et diminuer le bruit [140].

Une possibilité pour déconvoluer les images si on connaît la FTM est de passer dans l'espace de Fourier, la convolution est alors un produit et la solution une simple division :

$$\tilde{I}_{\text{déconvolué}} = \frac{\tilde{I}}{FTM} \quad (4.26)$$

Avec  $\tilde{X}$ , la transformée de Fourier de la fonction  $X$ ,  $I_{\text{déconvolué}}$  et  $I$  respectivement les images déconvoluées et originales.

Le principal problème de la méthode est que la FTM est une fonction qui contient des zéros correspondant aux fréquences filtrées par le système optique. La division de l'image à déconvoluer par la FTM peut mener à augmenter le bruit de façon importante et ainsi, réduire l'intérêt de la déconvolution.

Dans un second temps, on cherche à rehausser les fréquences atténuées à l'aide des FTM calculées grâce à des simulations numériques et présentées précédemment. L'image expérimentale n'étant pas exempte de bruit, si l'on compense directement les fréquences de l'image grâce à la FTM, le bruit va être également amplifié. Il faut donc arriver à discriminer le signal utile du bruit afin de ne rehausser que les fréquences utiles à la reconstruction de l'image.

Pour éviter cela, il est d'usage d'utiliser une régularisation qui permet de substituer à la FTM une nouvelle FTM telle que :

$$\left\{ \begin{array}{l} \frac{1}{FTM_{reg}} \rightarrow 1 \text{ quand } FTM \rightarrow 0 \\ \text{et } \frac{1}{FTM_{reg}} \rightarrow \frac{1}{FTM} \text{ sinon} \end{array} \right. \quad (4.27)$$

On utilise la régularisation de Wiener [141] plus appropriée dans notre cas car elle tient compte du RSB. La nouvelle FTM s'écrit comme suit :

$$\frac{1}{FTM_{reg}(\nu)} = \frac{1}{FTM(\nu)} \cdot \frac{|FTM(\nu)|^2}{|FTM(\nu)|^2 + \frac{1}{RSB(\mu)}} \quad (4.28)$$

On utilisera cette FTM dans les différentes déconvolutions que l'on réalisera par la suite.

En conclusion de cette partie théorique et avant de présenter les résultats obtenus, on a montré que pour obtenir une image 3D d'un échantillon en phase ou en indice, il suffit de balayer l'échantillon axialement et de mesurer le champ  $\mathcal{EM}$  dans chacun des plans choisis. En utilisant un éclairage incohérent spatialement, on aura naturellement un effet de sectionnement optique qui révélera la structure tridimensionnelle de l'échantillon. On a présenté l'inconvénient de l'utilisation d'un tel type d'éclairage ainsi que le principe d'utiliser une déconvolution avec une FTM calculée par simulation d'images obtenues dans un régime d'illumination incohérent avec notre analyseur de front d'onde.

### 4.3 Résultats expérimentaux

Intéressons-nous maintenant à la réalisation expérimentale de la mesure et aux résultats obtenus. Dans cette partie, on présentera les différents résultats obtenus avec cette technique sur différents types d'échantillons en terme d'épaisseur mécanique. Une caractérisation des capacités de la technique de reconstruction et de détermination d'indice de réfraction sera réalisée sur un échantillon de billes de polystyrène de diamètre et d'indice connus. On passera ensuite à des échantillons de tissus plus épais et plus intéressants d'un point de vue biologique.

#### 4.3.1 Montage expérimental et protocole

Dans le cadre de la mesure, on utilise une illumination incohérente spatialement créée en utilisant un objectif et un condenseur à forte ouverture numérique. L'objectif est un objectif à immersion d'ouverture numérique 1.3 et le condenseur à immersion (Nikon, Japon) possède une ouverture numérique égale à 1.4.

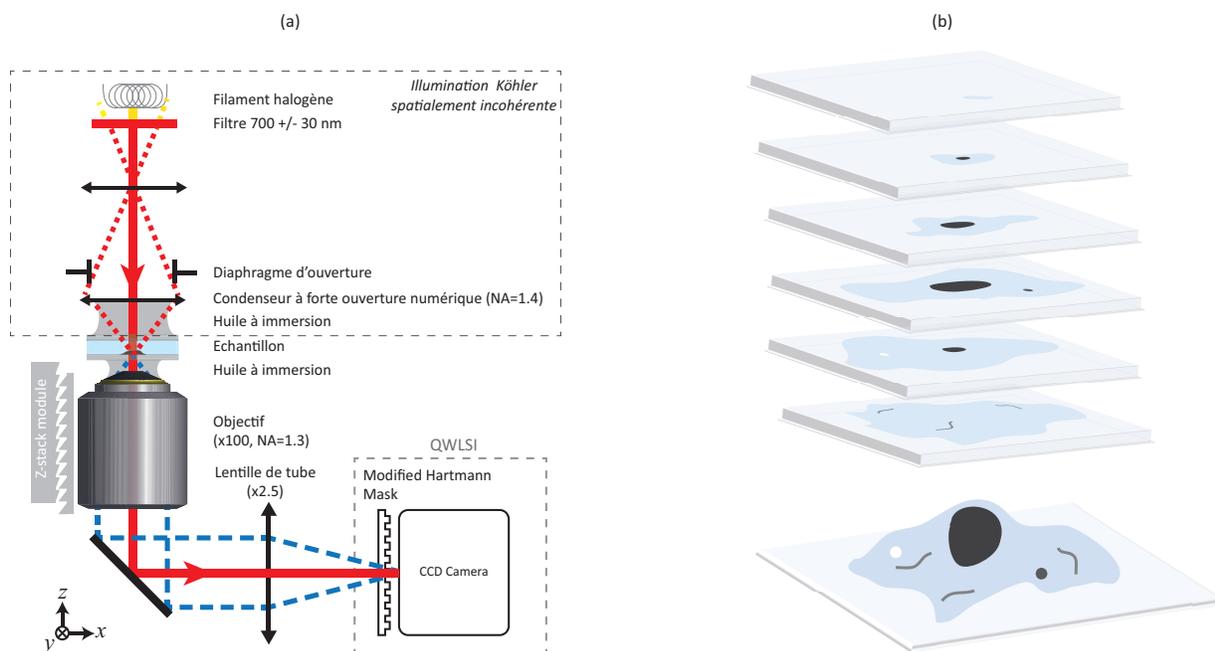


FIGURE 4.13 – (a) Représentation schématique du montage expérimental utilisé. Le diaphragme d'ouverture est conjugué avec la source et la pupille d'entrée de l'objectif et le diaphragme de champ est conjugué avec l'échantillon. (b) Représentation schématique de la réalisation d'un z-stack d'un échantillon.

L'ouverture numérique d'illumination et de collection utilisées pour les expériences qui seront présentées dans la partie 4.3.1.1 valent 1,3.

Pour focaliser l'objectif en différents plans de l'échantillon, une platine motorisée de type

piezo (PiFoc, Physik Instruments, Allemagne) est utilisée. Un filtre passe bande  $700\pm 30$  nm est ajouté sur le trajet d'illumination afin de négliger les phénomènes de dispersion et de dépendance de la fonction de transfert de modulation à la longueur d'onde.

La première étape pour réaliser une mesure consiste à régler l'éclairage. On réalise un éclairage de type Köhler classique afin de travailler en éclairage collimaté avec le condenseur à immersion. Le diaphragme d'ouverture du condenseur à immersion est ouvert de sorte à remplir exactement la pupille de l'objectif pour obtenir une ouverture numérique d'illumination égale à l'ouverture numérique de collection dans le cas où l'on veut un degré d'incohérence de 1. On rappelle que dans nos expériences, le même objectif de grandissement 100x et  $ON=1,3$  sera utilisé.

Le schéma du montage expérimental est présenté Figure 4.13(a). Une fois cette étape réalisée, il est préférable d'acquérir un z-stack de références correspondant à chaque plan qui sera imagé au niveau de l'échantillon afin de prendre en compte le fait que les aberrations varient avec la profondeur. On note qu'il est possible sur des tissus d'imager correctement des zones situées jusqu'à une cinquantaine de micromètres de profondeur avec une seule référence. Une série d'acquisitions est effectuée sur la zone d'intérêt au niveau de l'échantillon. Chaque interférogramme image est associé à un interférogramme de référence et le post traitement classique est appliqué afin d'en extraire l'OPD et l'intensité. Les FTM calculées sont alors utilisées pour déconvoluer le champ reconstruit.

Le schéma en blocs présenté en Figure 4.14 permet d'illustrer les différentes étapes (flèches en traits pleins) reliant l'acquisition d'interférogrammes à la déconvolution d'images avec en perspective la reconstruction d'indice (flèche en traits pointillés), encore à l'étude pour l'instant.

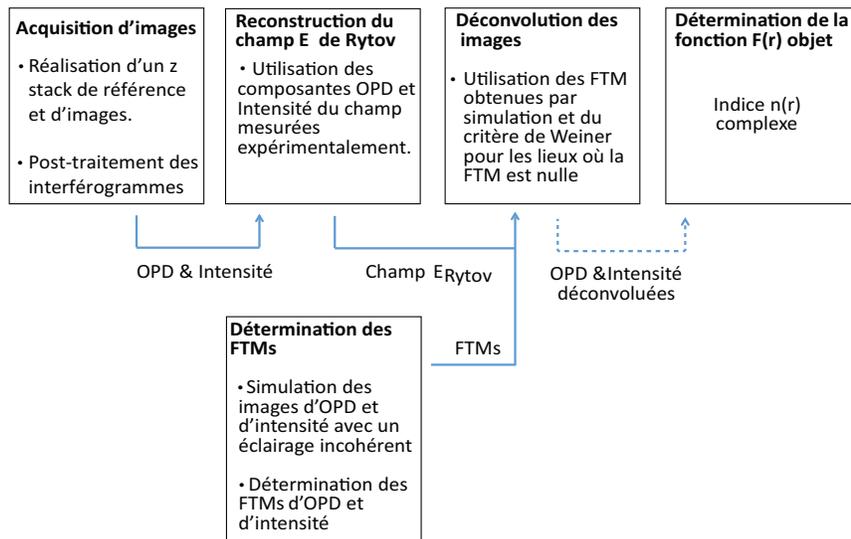


FIGURE 4.14 – Diagramme en blocs expliquant les différentes étapes de traitement menant de l'acquisition d'images à la détermination d'indice. Le trait en pointillés représente une étape encore non-réalisée.

### 4.3.1.1 Application de la mesure à l'imagerie d'échantillons calibrés

On commence par appliquer notre technique à la reconstruction d'un objet dont on connaît l'indice. Il s'agit de billes de polystyrène (Sigma-Aldrich, St-Louis, USA) de  $5\mu\text{m}$  de diamètre et d'indice de réfraction théorique 1,620 à  $\lambda=700\text{ nm}$ . Ces billes sont placées dans un milieu d'immersion (Cargille, Cedar Grove, USA) dont l'indice a été déterminé à 1,542 avec un réfractomètre commercial (2WAJ, HuiXia Supply, China) entre lame et lamelle afin de pouvoir réaliser l'imagerie. On compare deux z-stacks d'une bille de l'échantillon acquis en utilisant des illuminations spatialement cohérente (diaphragme d'ouverture fermé) et incohérente (diaphragme d'ouverture ouvert). Les résultats sont présentés en Figure 4.15. On visualise les acquisitions dans le plan de focalisation (au niveau du centre de la bille) dans le plan XY et on réalise une coupe passant par le centre de la bille et suivant l'axe XZ afin de visualiser la résolution axiale obtenue. Le z-stack obtenu en éclairage cohérent est le résultat d'une propagation numérique. Dans un premier temps, on peut constater la chute de valeur d'OPD au niveau des images dans le plan XY obtenues en régime incohérent sans compensation et qui est visualisable directement sur la Figure 4.15(e). La valeur d'OPD dans le plan  $z=0$  vaut 240,2 nm en incohérent contre 405,8 nm en cohérent. La valeur théorique qui peut être calculée en utilisant l'approximation projective est de :  $OPD_{théorique} = 5 \times (1,620 - 1,542) = 405\text{ nm}$ , ce qui correspond parfaitement à la valeur expérimentale mesurée de  $405,8 \pm 1,1\text{ nm}$ . L'écart type de la valeur d'OPD a été évaluée sur une zone de  $50 \times 50$  pixels de fond sur l'image.

En illumination incohérente, on observe l'absence de rebonds de diffraction visibles sur l'image en illumination cohérente. La coupe suivant l'axe y sur tout le stack d'images nous permet d'apprécier l'augmentation de résolution axiale : la bille est maintenant résolue axialement. L'utilisation d'une illumination incohérente se traduit sur les images par une structure en "v" de chaque côté de la bille pour les images hors focus et dûe à la structure en lobes de la FTM 3D (Figure 4.15(b)). L'utilisation d'une déconvolution à l'aide d'une FTM3D permet de réduire fortement ces artéfacts comme on peut le voir sur l'image (c) de la Figure 4.15. Le halo clair autour de la bille et sa forme viennent du fait qu'il existe un ensemble de fréquences, particulièrement suivant z qui ne sont pas collectées. En tomographie diffractive, on parle de *missing apple core* pour faire référence à cette zone fréquentielle lacunaire suivant l'axe optique.

En ce qui concerne le profil présenté en Figure 4.15 (g) et tracé sur l'image 4.15 (c), l'aspect est plus plat que celui du profil de l'image (a) de la Figure 4.15 et correspond à la valeur d'OPD de la tranche de bille imagée. La valeur d'OPD de cette tranche est de  $30,7 \pm 0,3\text{ nm}$ . Si l'on somme la contribution de toutes ces tranches, on trouve un résultat de  $450 \pm 8\text{ nm}$ . Cette valeur est assez éloignée des 405 nm attendus et l'interprétation de ce résultat ainsi que la méthode de mesure de la valeur intégrée de l'OPD déconvoluée sont encore à l'étude.

Enfin, en utilisant une déconvolution par FTM2D, on peut compenser la perte de contraste dans le plan médian  $z=0$  comme en atteste le profil tracé sur l'image (voir Figure 4.15(f)). Cette image déconvoluée possède moins de rebonds de diffraction que l'image obtenue en

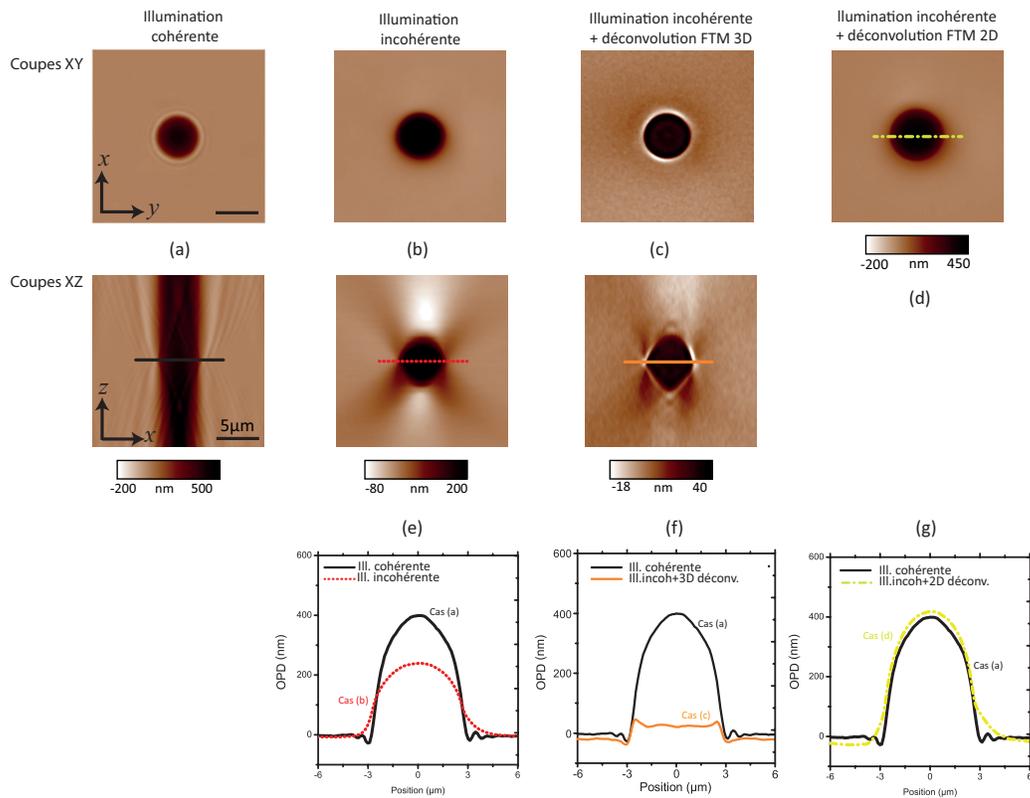


FIGURE 4.15 – Présentation des différentes images d’OPD d’une bille de polystyrène de  $5\mu\text{m}$  de diamètre. Haut : coupes XY dans le plan  $z=0$  et bas : coupes XZ en  $y=0$  en illumination (a)cohérente, (b) incohérente, (c) incohérente avec déconvolution par FTM 3D. (d) Coupe XY dans le plan  $z=0$  de l’image d’OPD incohérente avec déconvolution par FTM 2D. (e), (f) & (g) Profils suivant  $x$  et passant par le centre de la bille tracés sur les différentes images de coupe XZ (a) à (d).

illumination cohérente et le caractère quantitatif, dans le cas où l’on image le plan au focus, est restauré. Ceci signifie que l’interprétation des images déconvoluées avec cette FTM2D est équivalente à celle réalisée en régime cohérent spatialement.

En conclusion à cette première caractérisation des performances de la mesure, on peut dire que le montage permet d’accroître les résolutions axiales et latérales de l’image. La résolution axiale permet la création de tranches optiques au sein de l’échantillon, ce qui permet de mesurer une OPD dans une tranche et non plus intégrée sur tout l’échantillon.

### 4.3.2 Application de la mesure à l'imagerie de tissus et d'objets d'épaisseur inférieure à 15 microns (monocouche)

#### 4.3.2.1 Reconstruction tomographique d'une cellule épithéliale

On étudie dans un premier temps une cellule de type HeLa, type cellulaire déjà décrit précédemment en partie 2.4.4.2 du Chapitre 2. Ces cellules épithéliales sont choisies pour cette expérience en raison de leur capacité à s'étaler sur leur support. La cellule est placée entre deux lamelles avec du milieu de culture pour la maintenir vivante. On peut alors imaginer et visualiser différentes structures telles que la membrane, les lamellipodes, extensions membranaires en périphérie de la cellule, les différentes vésicules à l'intérieur du cytoplasme ou encore les nucléoles qui apparaissent plus contrastés que le reste du cytoplasme. Différents plans de la cellule imagée sont présentés en Figure 4.16. On réalise un z-stack de

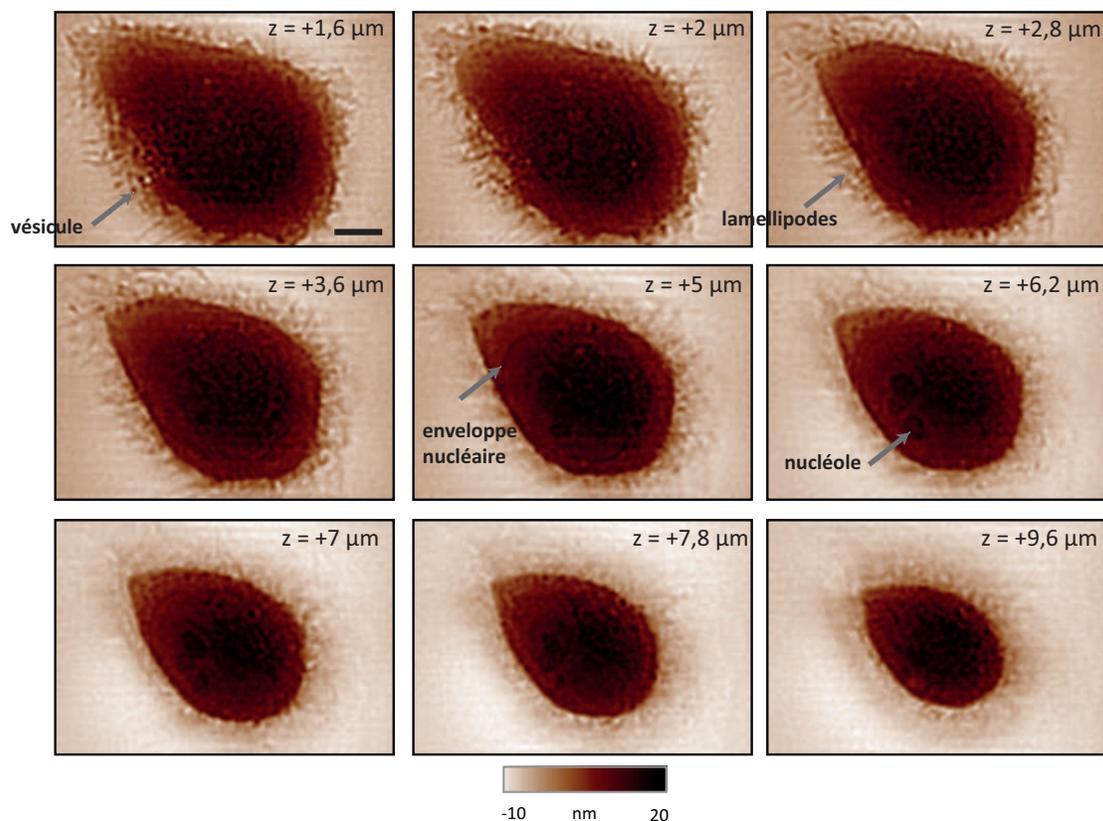


FIGURE 4.16 – Z-stack d'images d'OPD obtenues en illumination incohérente et déconvoluées grâce à une FTM3D. Visualisation des constituants présents dans les différents plans. Pas du z-stack =  $0,2 \mu\text{m}$ , grandissement  $280\times$ ,  $ON_{collection} = ON_{illumination} = 1,3$ . Échelle =  $5 \mu\text{m}$ .

cette cellule en traduisant l'objectif par rapport à l'échantillon suivant l'axe optique. L'acquisition du z-stack d'interférogrammes dure 15 secondes. Chaque interférogramme

est moyenné 5 fois et chaque interférogramme pris en référence est moyenné 30 fois afin de gagner en rapport signal sur bruit. On représente quelques-unes de ces images en Figure 4.16 afin d'avoir une idée des structures présentes dans les différents plans. Les premières images permettent de visualiser la membrane plasmique ainsi que les lamellipodes de la cellule qui se trouvent au niveau de la lamelle. Les images suivantes rendent compte de l'organisation dans l'espace des différents éléments de la cellule. On peut voir de multiples vésicules qui apparaissent au fur et à mesure que l'on parcourt la cellule. Le contraste permet de visualiser l'enveloppe nucléaire et les différents nucléoles à l'intérieur du noyau. La plus grosse structure dense visualisée à l'intérieur de la cellule correspond au noyau de la cellule.

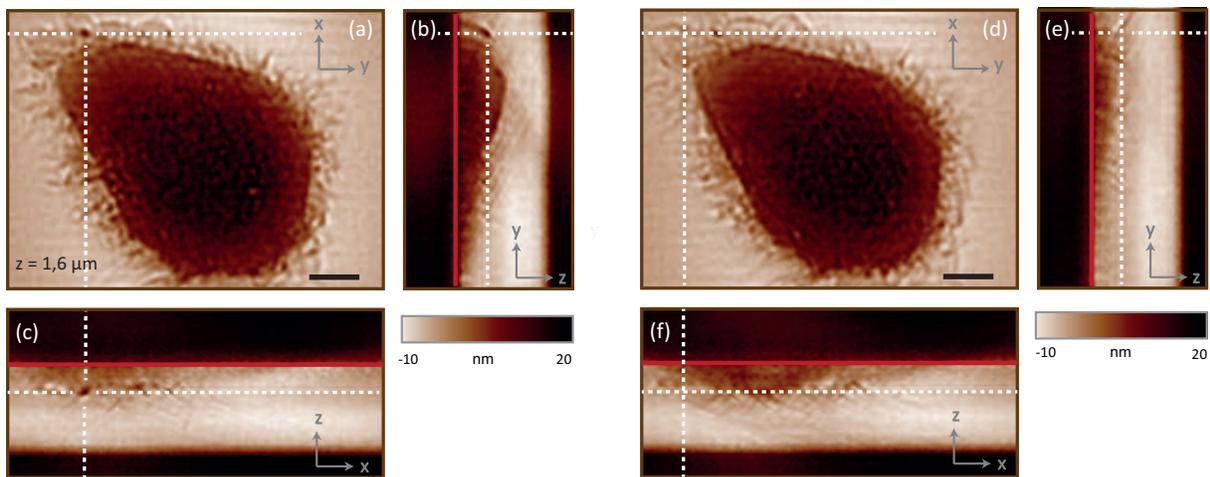


FIGURE 4.17 – (a), (d) Stack d'images d'OPD déconvoluées à l'aide d'une FTM 3D et (b), (c) & (e), (f) coupes orthogonales suivant deux axes du stack respectivement au niveau d'une vésicule présente au sein de lamellipodes et au niveau d'un lamellipode de la cellule. Images de grandissement final 280x réalisées avec un objectif (100 x, ON=1,3) et un condenseur à immersion d'ON=1,3.

On choisit de représenter une visualisation du stack d'images de la cellule en coupes orthogonales. En effectuant des coupes orthogonales suivant différents axes on peut de cette façon reconstruire la topographie de la cellule. La première coupe est présentée en Figure 4.17. Elle est effectuée sur une vésicule présente au niveau de la membrane plasmique. Les axes de la coupe sont symbolisés par les traites blancs en pointillés sur les images. La cellule repose entièrement sur son support ainsi qu'on pouvait déjà le constater grâce aux différentes images de la Figure 4.16, la lamelle est matérialisée par un trait rouge sur l'image. On peut voir que la vésicule suivant laquelle les coupes ont été réalisées est résolue axialement (image (c)), on peut la localiser précisément à  $\pm 0,2 \mu\text{m}$  près (pas du stack

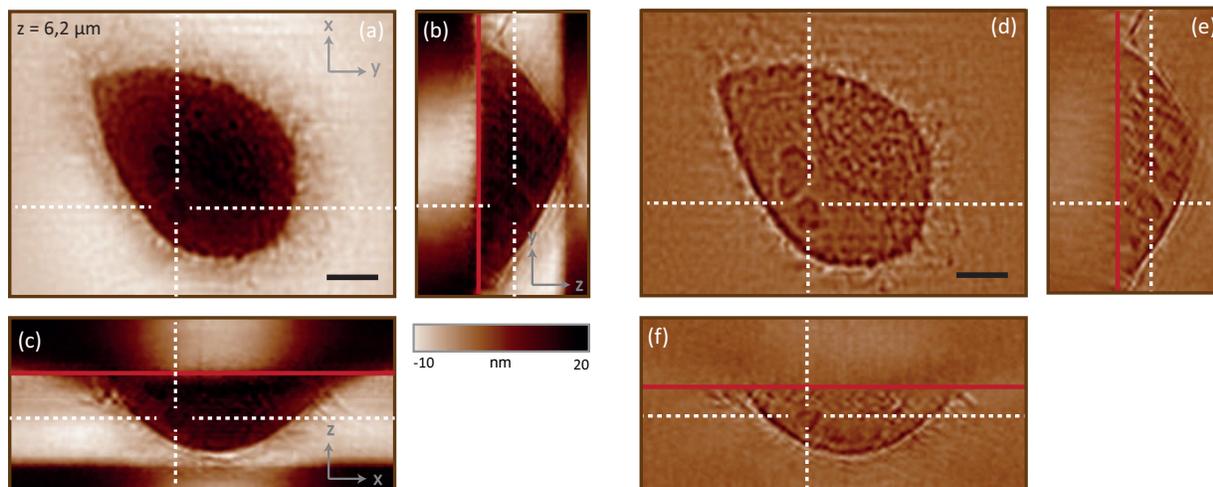


FIGURE 4.18 – Stack d’images d’OPD déconvoluées à l’aide d’une FTM 3D (a) brutes et (d) filtrées à l’aide d’un filtre passe haut. Coupes orthogonales suivant deux axes du stack d’images (b), (c) brutes et (e), (f) filtrées à l’aide d’un filtre passe haut au niveau d’une vésicule présente au sein de lamellipodes de la cellule. Images de grandissement final 280x réalisées avec un objectif (100 x, ON=1,3) et un condenseur à immersion d’ON=1,3.

d’images) et une mesure d’épaisseur est possible. La mesure donne une dimension axiale de  $1,4 \pm 0,2 \mu\text{m}$  et un profil tracé sur l’image donne une dimension latérale de  $1,27 \pm 0,1 \mu\text{m}$ , ce qui est en accord avec la mesure axiale. Sur cette même figure, on a également réalisé une coupe orthogonale suivant une zone au niveau des lamellipodes de la cellule. On peut voir que ces structures très fines sont surtout localisées au niveau de la lamelle. Sur l’image 4.17, deux coupes sont présentées. Les images (a), (b) et (c) correspondent à des images brutes et les images (d), (e) et (f) aux images correspondantes avec application d’un filtrage passe haut afin de visualiser les détails à l’intérieur de la cellule. La cellule est de forme arrondie et son épaisseur maximale a été évaluée à près de  $14 \pm 0,2 \mu\text{m}$ . Grâce à la résolution axiale et au contraste de la technique, on peut visualiser les nucléoles de la cellule, structures de forme globalement ronde apparaissant denses au sein du noyau. On effectue des coupes orthogonales au niveau d’un des 3 nucléoles de la cellule (voir Figure 4.18). On estime la dimension axiale du nucléole à  $2,8 \pm 0,2 \mu\text{m}$ .

L’imagerie en éclairage incohérent d’un échantillon fin constitué d’une seule cellule permet de résoudre axialement ses constituants intra-cellulaires tels que des vésicules ou les nucléoles et de pouvoir mesurer leurs dimensions axiales. Intéressons-nous maintenant à l’imagerie d’un objet constitué de plusieurs couches de cellules empilées les unes sur les autres.

### 4.3.2.2 Reconstruction tomographique d'un tissu de 14 $\mu\text{m}$ d'épaisseur

On commence par l'étude d'un échantillon constitué de deux couches cellulaires de 14  $\mu\text{m}$  d'épaisseur de tissu de peau de souris monté dans un milieu appelé mowiol et placé entre lame et lamelle. Les résultats sont présentés en Figure 4.19. On présente différentes images prises à des profondeurs différentes au sein du tissu (Figure 4.19(a),(b) et (c)) afin de rendre compte de la structure du tissu. On peut notamment voir qu'au croisement des traits en pointillés sur les images en coupe XY, deux cellules sont présentes à des profondeurs différentes, ce qui se traduit au niveau de la coupe en XZ par deux couches cellulaires superposées.

Le contraste de l'image permet d'imager la membrane plasmique des cellules et ainsi de délimiter les différentes cellules entre elles. Le noyau, certaines structures identifiées comme étant des nucléoles présentes à l'intérieur de celui-ci (mises en évidence grâce à un agrandissement de la Figure 4.19(a)), et des vésicules au sein du cytoplasme. En faisant défiler les images prises à différentes profondeurs, on peut apprécier la forme du noyau et la coupe orthogonale suivant les axes z et y comme celle réalisée permet de remonter aux épaisseurs mécaniques des cellules superposées dont le diamètre est estimé à environ  $5 \pm 0,2 \mu\text{m}$ .

L'épaisseur totale du tissu délimitée sur l'image par un trait rouge symbolisant la lamelle et un trait vert en pointillés est estimée à 15  $\mu\text{m}$  ce qui est très proche de l'épaisseur théorique de la couche de tissu imagée. On notera que l'épaisseur *théorique* et en réalité une épaisseur indicative et que la façon dont est réalisée la coupe ainsi que les différents traitements auxquels est soumis le tissu peut modifier son épaisseur réelle.

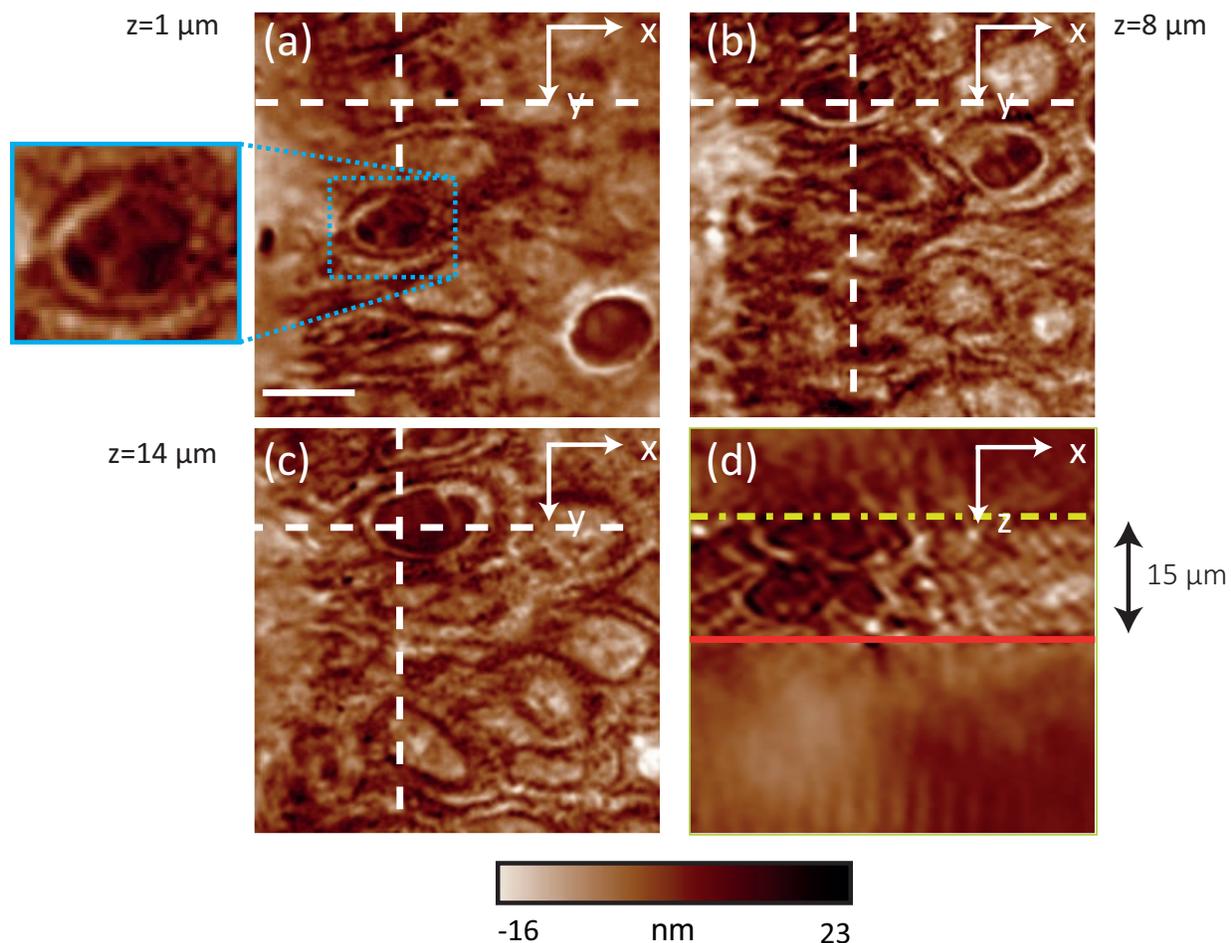


FIGURE 4.19 – (a),(b) & (c) Images d’OPD déconvoluées choisies à des profondeurs allant de 1 à  $14 \mu\text{m}$ . (b) image d’OPD déconvoluée au centre du z-stack. (d) Coupe orthogonale du stack suivant les traits en pointillés blancs. Le trait rouge représente la lamelle et le trait en pointillés vert représente la limite de l’échantillon. L’échelle représente  $10 \mu\text{m}$ .

### 4.3.3 Application de la mesure à l’imagerie de tissus épais

Maintenant que l’on a démontré la faisabilité de la mesure sur des éléments d’une dizaine de microns, on réalise l’imagerie d’un échantillon de coupe coronale de tissu de cerveau de souris au niveau de l’hippocampe d’une épaisseur de  $80 \mu\text{m}$ . Deux types d’images réalisées sur ce même tissu seront présentées : des z-stacks suivant l’axe optique obtenus à fort grandissement et dont l’objet est de voir les différentes couches de constituants au sein du tissu et des mosaïques d’images obtenues à plus faible grandissement et permettant de voir les différentes zones de l’hippocampe. On se place en éclairage semi-cohérent dans un premier temps afin de pouvoir bénéficier des avantages de ce type d’illumination en ce qui concerne la résolution et l’absence de rebonds de diffraction sans trop altérer le contraste

et on image différentes zones du tissu en associant les images afin de reconstruire une plus grande partie de celui-ci (voir Figure 4.20 (c)). Le contraste des images permet ainsi de différencier les zones délimitées en fonction de leur aspect morphologique sur l'image par des traits blancs en pointillés. On peut faire de cette façon le parallèle entre les différentes structures et celles observées sur l'image obtenue par microscopie confocale (cadre en pointillés blanc) présentée 4.20. Le très bon contraste des images d'OPD permet de réaliser des études morphologiques au même titre que des techniques de fluorescence. En effet, on peut voir une succession de couches différentes à mesure que l'on s'enfonce en profondeur dans le cerveau. Ces couches ont une structuration et des fonctions différentes. On les délimite visuellement sur l'image grâce à des traits en pointillés blancs. Des différences sont mises en évidence grâce à des carrés de couleur sur la 4.20(c). On distingue ainsi des zones constituées de neurones (carré de couleur verte), de fibres (milieu très orienté, carré de couleur orange) ou encore de prolongements neuronaux également orientés (carré de couleur rose) ou encore des zones sans structure réelle (carré de couleur bleue).

On réalise une reconstruction tomographique d'une zone au sein du gyrus denté constituée de multiples couches de neurones (corps cellulaires et leurs prolongements). Les résultats sont présentés Figure 4.21. On peut voir différentes images présentées dans différents plans. la totalité du z-stack permet d'évaluer une dizaine de couches cellulaires empilées les unes sur les autres. On présente également les images déconvoluées qui permettent de mettre en évidence tous les détails à l'intérieur des neurones, en particulier des vésicules au sein du corps cellulaire.

On peut également réaliser des images où l'information de profondeur est codée en couleur. Dans l'exemple présenté en Figure 4.22, on représente la position de globules rouges présents dans des vaisseaux au sein du même tissu que celui utilisé précédemment. Les globules rouges (mis en évidence sur une image à l'aide d'un carré de couleur bleue) étant beaucoup plus déphasants que les neurones (carré de couleur orange) et leurs prolongements, il apparaissent très contrastés par rapports à ces derniers qui constituent le fond de l'image. Les zones claires entourant les globules rouges sont des vaisseaux (carré de couleur verte). Une images peut être créée à partir de ces informations dans différents plans qui permet de visualiser les différentes structures en fonction de leur profondeur au sein du tissu.

En conclusion, on voit qu'une imagerie sur des tissus de 80  $\mu\text{m}$  constitués de multicouches cellulaires est possible. On garde un bon contraste sur toute l'épaisseur du tissu, ce qui nous permet de récupérer l'information de position des différentes structures les unes par rapport aux autres.

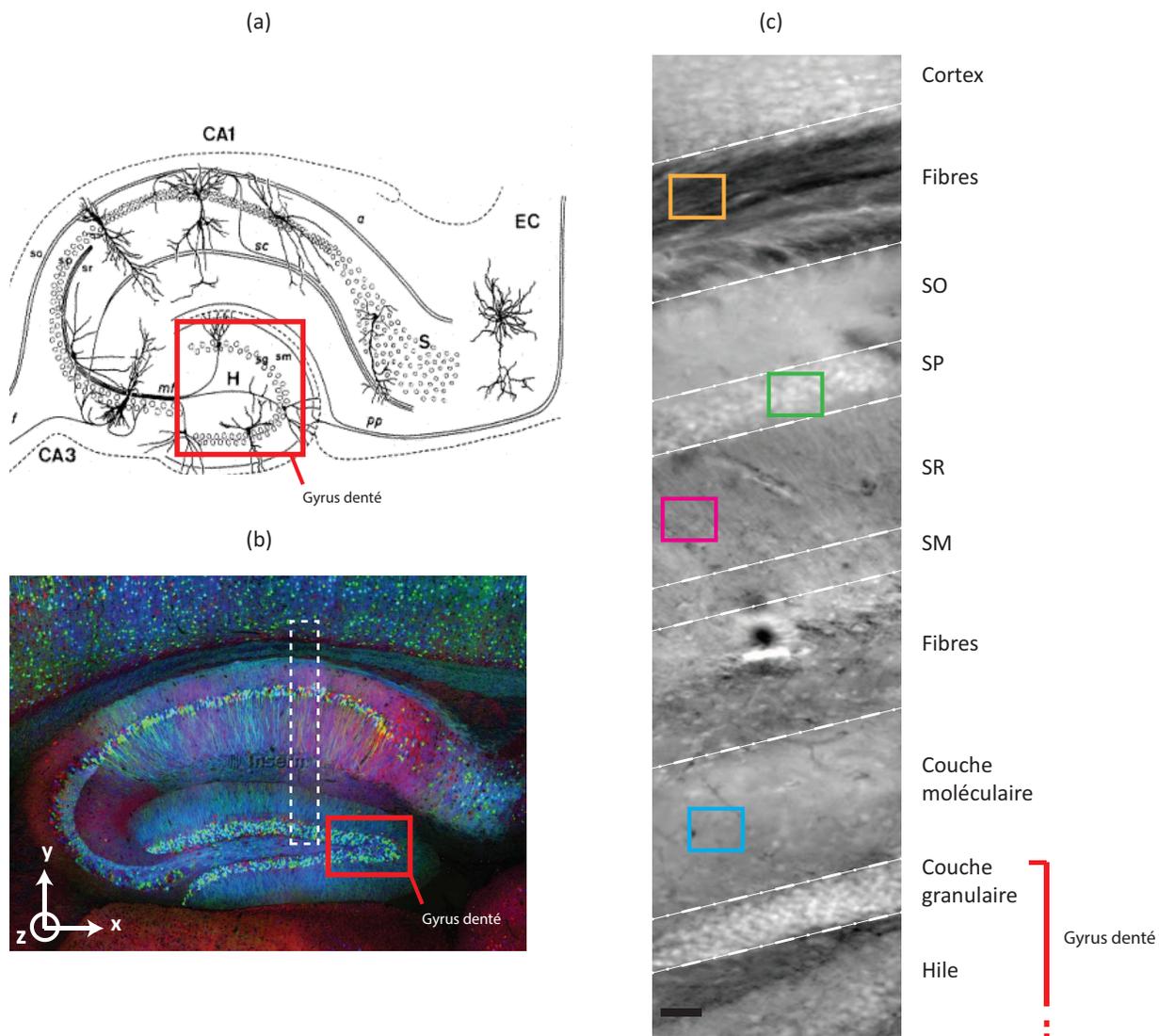


FIGURE 4.20 – (a) Schéma [142] représentant les différentes structures ainsi que leurs liaisons grâce au réseau de neurones au sein de l'hippocampe. sm : stratum moléculaire, sg : stratum granulosum, mf : fibres moussues, so : stratum oriens, sp : stratum pyramidale, sr : stratum radiatum, H : hile. Le gyrus denté est mis en évidence en rouge. (b) Image de microscopie confocale d'une coupe coronale de l'hippocampe (source : INSERM) Les axes du stiching représenté en (c) et du z-stack présenté dans la Figure suivante sont tracés sur l'image. (c) Sticking d'images d'OPD avec un objectif de grandissement 40x, ON=0,75 correspondant à une zone identique à celle mise en évidence sur la Figure (b). Les différents carrés sur l'image permettent de mettre en évidence des zones morphologiquement différentes au niveau du tissu. Échelle = 20  $\mu\text{m}$ .

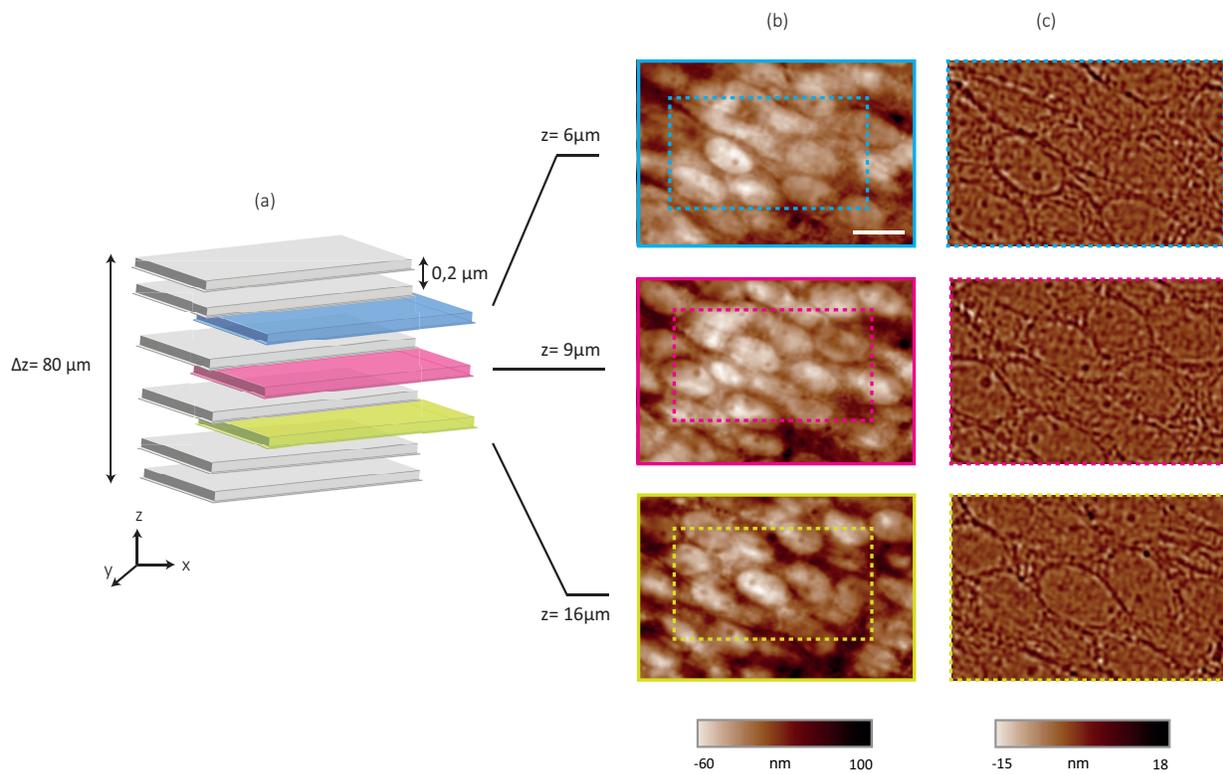


FIGURE 4.21 – (a) Représentation schématique d’un z-stack. (b) Images d’OPD non déconvoluées prises à des profondeurs de 6, 9 et 16  $\mu\text{m}$ , (c) Images d’OPD déconvoluée calculées à partir des zones entre pointillés des images d’OPD présentées en (b). Observation avec un grandissement 200x,  $ON_{collection} = ON_{illumination} = 1,3$ . Échelle =  $6 \mu\text{m}$ .

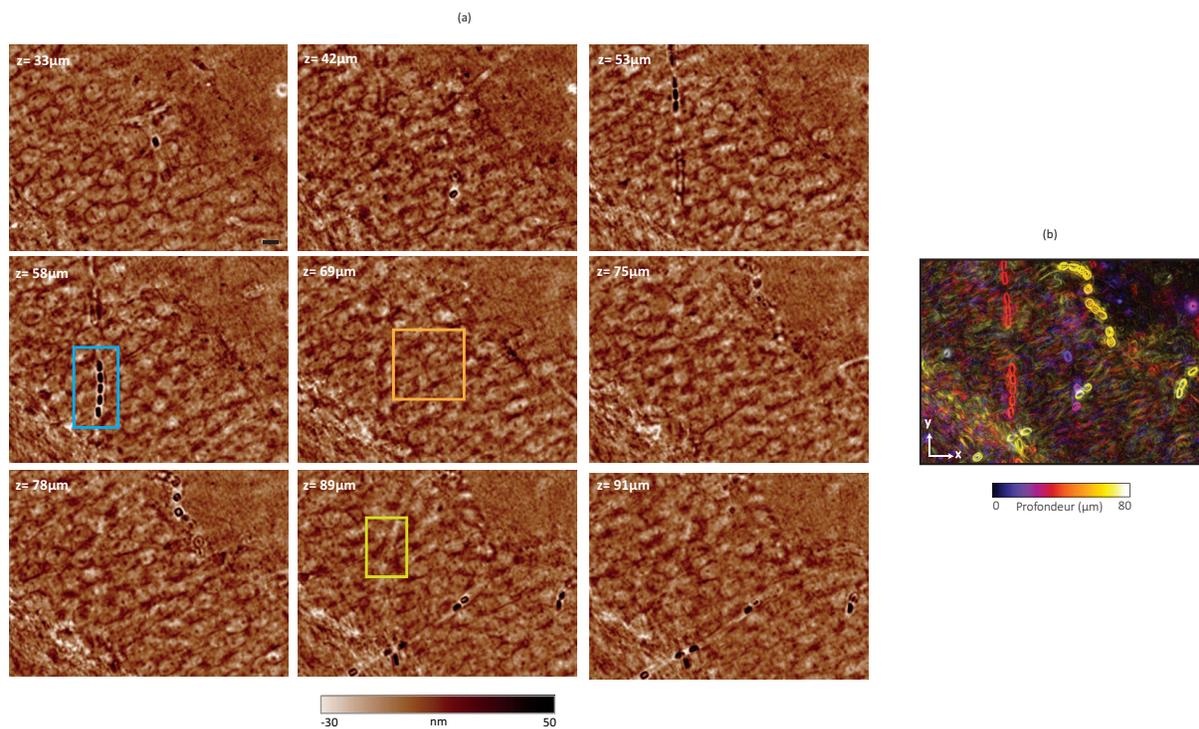


FIGURE 4.22 – (a) Série d'images d'OPD filtrées avec un filtre passe haut choisies et prises à des profondeurs d'imagerie différentes allant de 33 à 91  $\mu\text{m}$ , (b) Projection suivant la profondeur du maximum d'OPD. Observation au grossissement 100x,  $\text{ON}_{\text{collection}} = \text{ON}_{\text{illumination}} = 1,3$ . Échelle = 5  $\mu\text{m}$ .

## 4.4 Conclusions

En conclusion, la possibilité de travailler en illumination spatialement incohérente fait de l'association des principes de tomographie diffractive à l'imagerie de phase par IDQL une technique puissante et très prometteuse pour l'imagerie de tissus biologiques. En une dizaine de secondes selon l'épaisseur de tissu imagé et du pas souhaité entre chaque image, on peut réaliser un z-stack d'un échantillon. Cette technique est donc compatible avec l'imagerie d'échantillon vivants, le traitement des interférogrammes enregistré se faisant post-acquisition.

Le majeur inconvénient de cette application réside dans la chute de contraste qui rend l'interprétation des images impossible sans post-traitement. Un calcul de la FTM 3D du système complet comprenant le système d'imagerie ainsi que le détecteur qui suppose la simulation d'images d'OPD et d'intensité pour, respectivement, un objet de phase et d'intensité constitués de multiples fréquences latérales et axiales, doit être réalisé. Pour l'instant, le passage de l'OPD déconvoluée à l'indice de réfraction est encore à l'étude.

En terme de résolutions théoriques latérales et axiales, l'amélioration rend cette technique comparable à la microscopie de fluorescence conventionnelle et aux techniques de tomographie diffractive.

Nous avons montré qu'il existait deux façons d'utiliser l'illumination spatialement incohérente. Dans un premier temps, on peut chercher à bénéficier de l'augmentation de résolution en restant dans le cadre du régime projectif, les images sont alors interprétables uniquement dans le plan d'imagerie comme dans le cas d'une illumination cohérente. On peut alors grâce à une FTM en 2D réaliser une déconvolution des images et obtenir ainsi des images d'OPD deux fois plus résolues latéralement et avec moins d'artéfacts dûs à l'information des plans hors focus. Les applications développées précédemment de mesure de biréfringence, d'indice dans le cas de fibres et de masse sèche peuvent donc être également réalisées avec ces images plus résolues.

L'atout de cette technique, outre sa facilité d'implémentation réside dans le fait que des échantillons épais vont pouvoir être imagés et étudiés, ce qui ne pourrait pas être le cas avec des techniques de tomographie diffractive basées sur des techniques de mesure de phase cohérentes spatialement, qui nécessitent de garder une forte cohérence spatiale et qui sont contraintes à une imagerie sur échantillons fins ou peu diffractants.

On a montré qu'une localisation d'éléments intra-cellulaires au sein d'une cellule d'une dizaine de  $\mu\text{m}$  est possible ainsi qu'une détermination de leur dimension axiale. Le passage à des échantillons de tissus composés de plusieurs couches cellulaires a été effectué allant jusqu'à l'imagerie et la localisation en profondeur de structures jusqu'à 80  $\mu\text{m}$  en deçà de la lamelle. Une étude sur la détermination de la dimension latérale des objets par cette méthode et des éventuels facteurs qui pourraient rendre cette mesure erronée, notamment le fait d'utiliser un milieu différent entre l'échantillon et l'objectif ainsi que de déplacer l'objectif et non l'échantillon pour créer le z-stack est en cours.

## 4.5 Perspectives

### 4.5.1 Correction des images grâce à l'utilisation d'optique adaptative

On sait qu'à partir d'une certaine profondeur, l'image se dégrade en raison de l'aberration sphérique qui se traduit par l'apparition d'un flou sur les images. Afin de contrer ce phénomène, le travail réalisé actuellement est d'utiliser une boucle d'optique adaptative qui va nous permettre de corriger l'aberration sphérique visible sur les images à mesure que la profondeur à laquelle on réalise l'imagerie augmente. De plus, il n'existe pas d'objectif comportant une bague de compensation de la profondeur d'imagerie. Un exemple de la dégradation de la qualité des images est présenté Figure 4.23.

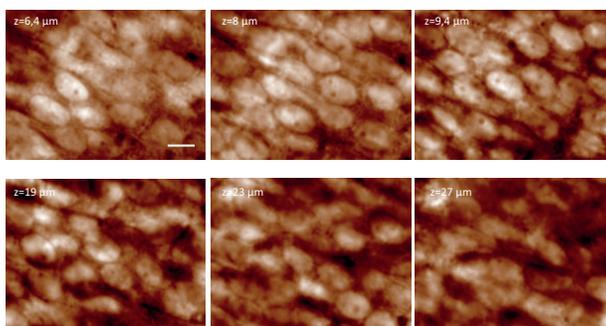


FIGURE 4.23 – Images d'OPD déconvoluées prises à des profondeurs d'imagerie différentes. Observation avec un grandissement 200x,  $ON_{collection}=ON_{illumination}=1,3$ . Échelle=5  $\mu\text{m}$ .

On utilise un système afocal et un miroir déformable (Hi-Speed DM97-15, Alpao, France) afin de pouvoir corriger le faisceau entre le microscope et l'analyseur de front d'onde. Un second analyseur de front d'onde est utilisé afin de calibrer le miroir déformable. Le processus de calibration ne sera pas traité ici. On pourra ainsi appliquer ou non une correction sur les images pendant la réalisation des acquisitions. Une étude est encore en cours.

Une seconde piste pour le système de correction qui est à l'étude est basée sur les travaux publiés par l'équipe de Débarre et al [143, 144] qui corrigent leurs images de tissus épais obtenues par des techniques multi-photons. Le but est de pouvoir réaliser une correction automatique sur un critère plus objectif que celui développé actuellement qui est purement basé sur l'appréciation du "flou" par l'utilisateur. Ce montage expérimental a d'ailleurs fait l'objet d'un TP lors de l'école de microscopie fonctionnelle pour la biologie MiFoBio. La technique repose sur l'optimisation d'une correction appliquée sur les images avec un set d'aberrations donné à différentes profondeurs au sein du tissu. On choisit une grandeur que l'on va mesurer, appelée *métrique*, et dont l'optimisation (sa maximisation) sert à identifier le set optimal de correction. Cette métrique est choisie pour être optimale dans le cas d'une absence d'aberration. En général, en imagerie on choisira un maximum d'intensité.

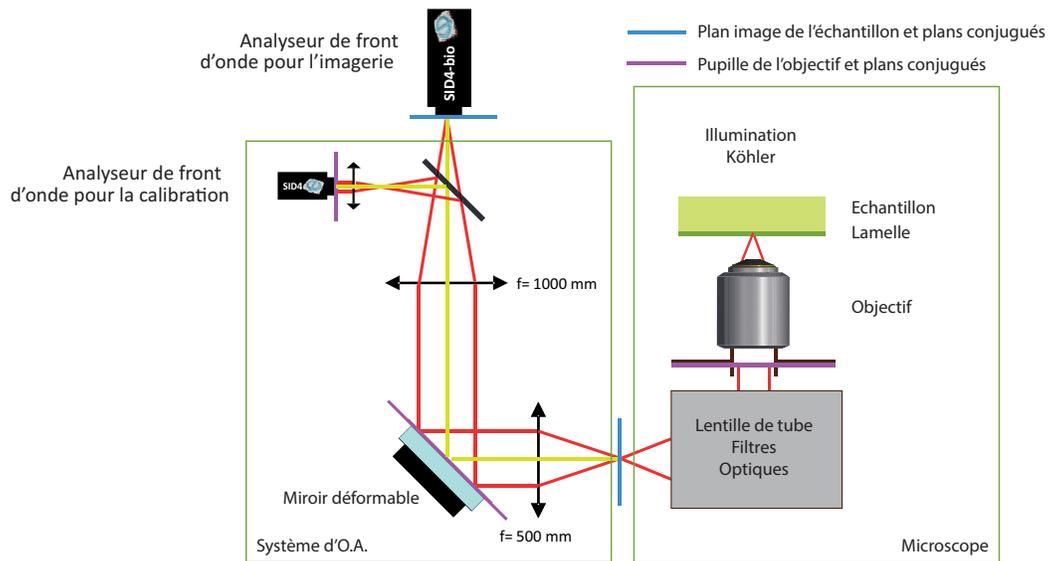


FIGURE 4.24 – schéma du montage expérimental permettant la correction du front d’onde en sortie du microscope.

Cette méthode est basée sur l’utilisation d’un composant actif comme un miroir déformable ou un SLM. On applique une déformation afin de compenser celle de l’échantillon ou du setup expérimental. Pour chaque mode de Zernike de correction que l’on veut apporter, en un  $z$  de profondeur donné, on acquiert différentes images en connaissant le taux d’aberration introduit par le composant actif. Pour chaque image, on mesure la grandeur choisie. On obtient ainsi une variation de la grandeur en fonction du taux d’aberration introduit qui suit un profil lorentzien [144] et qui doit exhiber un maximum pour un certain taux d’aberration introduit (voir Figure 4.25). Ce maximum correspond au taux d’aberration optimal pour maximiser la grandeur choisie et par conséquent la correction des images.

Dans l’idéal, le champ imagé est divisé en plusieurs sous régions afin de prendre en compte les différences de compositions et hétérogénéités du tissu en fonction du champ imagé. En effet, les tissus sont complexes et des structures de composition différente peuvent se succéder latéralement et axialement à mesure qu’on image le tissu.

La procédure précédente est ainsi réalisée pour chacune des sous régions. Dans notre cas, il faudra surtout prendre en compte les différences de compositions suivant l’axe optique du système puisque notre montage est réalisé en transmission et que l’information va être cumulée sur toute la tranche optique imagée.

Une procédure de calibration devra être effectuée au niveau de chaque champ d’intérêt et dans chaque plan qui sera imagé par la suite.

Nous avons développé un premier montage pour réaliser la correction de nos images. Une comparaison d’images prises dans deux plans différents est illustrée en Figure 4.26. On applique un filtre passe haut aux images afin de visualiser les détails qui sont corrigés. On a mis en évidence certaines zones sur l’image de la figure 4.26 (rectangles de couleurs sur les images) où l’on peut voir très nettement l’amélioration de la correction effectuée

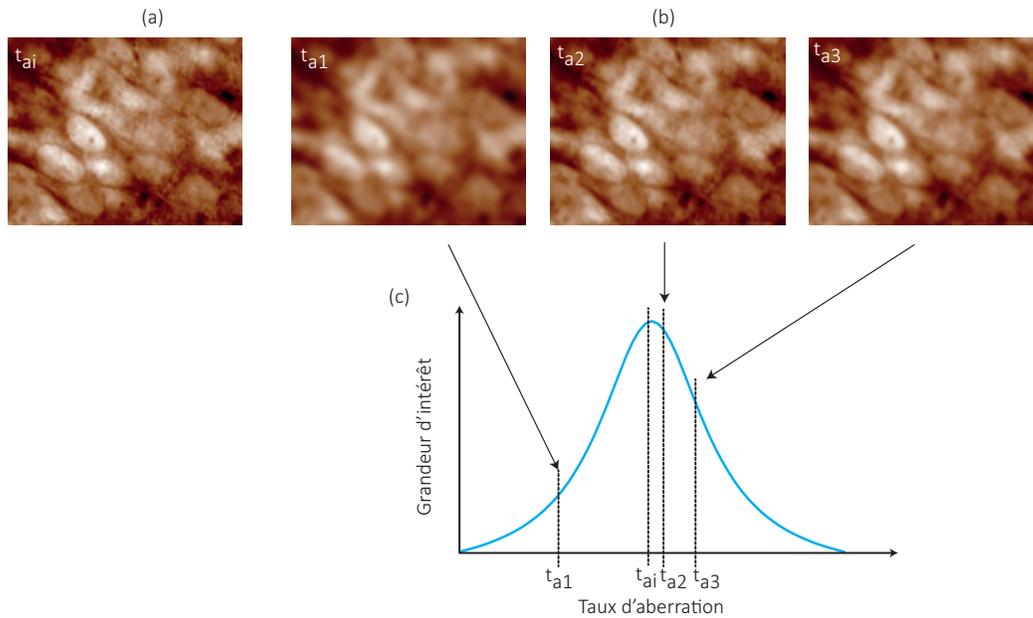


FIGURE 4.25 – Illustration schématique du principe de correction. (a) Image d’OPD originale comprenant un taux d’aberration  $t_{ai}$ , (b) différentes images d’OPD avec différents taux d’aberrations appliqués, (c) courbe représentant la valeur d’une grandeur d’intérêt en fonction du taux d’aberration de chaque image. Le maximum de la fonction est obtenu lorsqu’on compense exactement les aberrations initiales du système optique.

en terme de contraste des vésicules à l’intérieur des corps cellulaires et de netteté de la membrane.

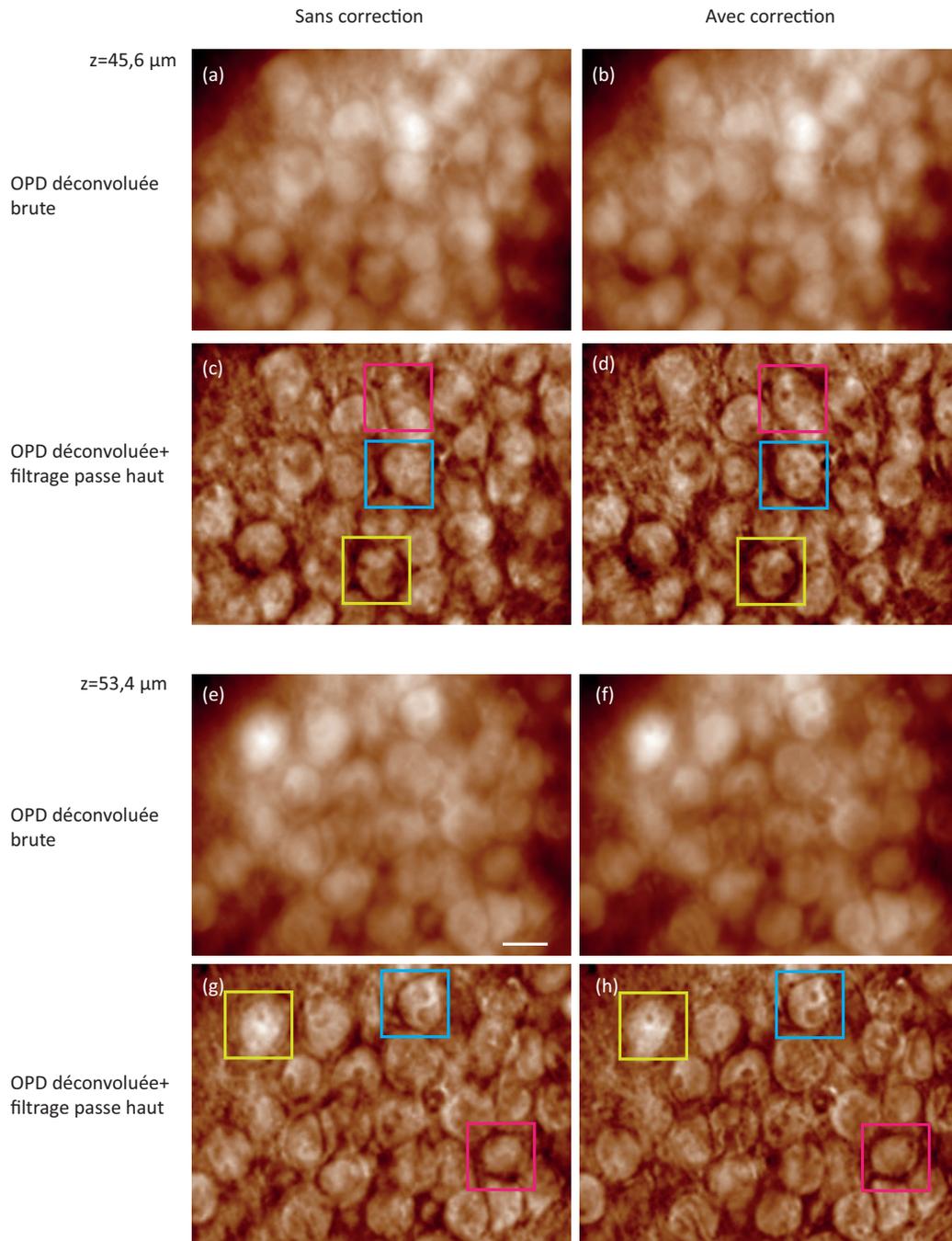


FIGURE 4.26 – Images de neurones prises dans deux plans d’imagerie différents. Images d’OPD déconvoluée brute sans (a), (e) et avec (b), (f) correction, images d’OPD déconvoluée avec filtrage passe haut sans (c), (g) et avec (d), (h) correction acquises respectivement à une profondeur de 45,6  $\mu\text{m}$  et 53,4  $\mu\text{m}$  de la lamelle. Observation avec un grandissement 200x,  $ON_{collection} = ON_{illumination} = 1,3$ .

### 4.5.2 Passage des techniques bidimensionnelles à l'imagerie tridimensionnelle

Les autres perspectives de la méthode sont basées sur un passage des techniques développées dans les chapitres précédents en 2D à la 3D.

On cherchera à mesurer le volume optique ou la masse sèche d'une tranche sectionnée optiquement au sein d'un échantillon 3D. On pourrait réaliser des mesures de masse sèche de cellules au sein d'un tissu par exemple, ou d'éléments intracellulaires comme des vésicules ou d'autres organites cellulaires en sommant la contribution des zones d'intérêt au sein des différents plans auxquels elles appartiennent.

Pour que la mesure soit pertinente, il suffit que ces objets soient suffisamment résolus en  $z$ , c'est-à-dire que leur dimension axiale soit au moins égale à la résolution axiale du système. On pourra également passer à une mesure au sein de tissus et réaliser des classifications de cellules en utilisant ce critère de masse sur les cellules directement ou sur un champ de cellules où les cellules ne sont plus individualisables comme dans certaines zones tumorales. Cette application est la plus simple à réaliser dans un premier temps, ne nécessitant pas la mise en place d'outils de simulation numérique supplémentaires.

La seconde perspective envisagée est de réaliser une imagerie de biréfringence dans des échantillons épais.

La principale difficulté pour cette application réside dans l'interprétation des images qui seront obtenues. De notre point de vue, c'est le développement qui demandera le plus d'efforts concernant la mise en place de nouveaux outils de simulation numérique.

---

## Conclusion et perspectives

---

Avec ce manuscrit, je me suis efforcée de présenter l'utilisation en microscopie d'une technique d'interférométrie à décalage quadri-latéral dans le cadre de trois différentes applications ayant pour but la mesure de masse sèche d'organismes cellulaires, la mesure et l'imagerie d'éléments biréfringents ainsi que la possibilité de reconstruire tri-dimensionnellement un échantillon biologique afin de rendre compte de sa structure.

La solution technique utilisée est un analyseur de front d'onde dont l'atout majeur réside dans la possibilité de l'utiliser comme un module *add-on* au niveau du plan image d'un microscope. L'intérêt de la technique est la création de contraste pour des échantillons semi-transparents, contraste qui est quantifiable puisque directement relié au déphasage introduit par l'échantillon. L'idée motrice de ces travaux est de montrer comment et à quoi on peut relier cette valeur de déphasage dans le cadre d'études menées sur des échantillons biologiques. Pour interpréter nos images et nos mesures pour des échantillons considérés comme bidimensionnels, une approximation est utilisée permettant de réaliser des mesures de différences de chemin optique avec des résolutions inférieures au demi nanomètre. Dans le cas où l'indice de réfraction de l'échantillon est connu, on peut de cette façon remonter à une valeur d'épaisseur et, si l'on connaît l'épaisseur de l'échantillon, alors on peut déduire des valeurs d'indices de réfraction.

La principale application directement issue de la mesure d'OPD est la mesure et le suivi de masse sèche de cellules. Cette mesure, après une première expérience de calibration sur différentes populations cellulaires dans un état du cycle bien défini (avec des blocages des cellules à certaines étapes du cycle), permet de donner une probabilité que la cellule se trouve dans un état précis du cycle. On peut de cette façon compter le nombre de cellules en mitose et calculer l'indice mitotique de la population, indice qui donne une indication de sa caractéristique proliférative. En étudiant l'évolution de la masse des cellules dans le temps, on a pu mesurer des taux de croissance et comparer cette valeur entre des populations d'un même type cellulaire mais placées dans des milieux induisant une croissance différente. L'application de la mesure à des échantillons est simple et pourrait permettre

en un minimum de temps de rendre compte d'un changement significatif de vitesse de croissance dans le cadre d'une étude de type pharmacologique sur l'effet d'un produit dans le milieu de culture. C'est l'application directe la plus prometteuse à mon sens considérant les performances de la mesure de masse sèche avec notre technique. En étudiant la valeur de masse sèche d'une population entière à un instant  $t$  et des paramètres morphologiques déduits de la segmentation des images, on peut réaliser une classification à l'aveugle des cellules et ainsi réaliser des études statistiques sur un très grand nombre de cellules de façon à quantifier le taux de cellules présentes à certaines étapes du cycle de façon simple. Un projet ANR, dont l'objet est de mettre en place cette technique de mesure sur un système haut débit afin d'acquérir rapidement un grand nombre de données, débutera en novembre 2014. La prise d'image en temps réel et la segmentation automatique des données associées à des algorithmes de classification performants (collaboration avec des équipes de morphomathématiciens) pourra permettre de réaliser des études sur des populations cellulaires à grandes échelles.

La mesure d'OPD telle que présentée dans le cadre de l'approximation projective permet une mesure globale sur tout l'échantillon mais il n'est pas possible grâce à cette mesure de ne contraster qu'un seul type de composant ou d'identifier spécifiquement un constituant au sein de l'échantillon. Nous avons démontré avec la seconde application présentée, les capacités du couplage d'une excitation polarisée avec l'imagerie de phase quantitative. Cette technique, implémentée sur tout microscope classique, a permis d'augmenter spécifiquement le contraste pour les structures anisotropes contenues dans un échantillon biologique et de réaliser des mesures de biréfringence d'éléments cellulaires. La mesure est simple et sans utilisation de détection polarisée, ce qui en fait un atout pour son utilisation en microscopie. Des mesures sur des cristaux et des fibres de collagène a également permis de mesurer une biréfringence avec un très bon accord aux valeurs théoriques. Dans le cas d'échantillons mobiles, le problème de la dynamique entraîne l'apparition d'artéfacts sur les images. De nouvelles solutions pour faire tourner la polarisation rapidement sont à l'étude actuellement afin de pouvoir nous approcher des vitesses typiques de mouvement de la cellule.

Le principal inconvénient de l'approche projective est le fait qu'il y ait corrélation entre épaisseur mécanique et indice de réfraction. La solution qui a été proposée est de coupler des principes de tomographie diffractive à l'imagerie de phase afin de pouvoir accroître résolutions latérales et axiales et pouvoir avoir une information suivant l'axe optique de l'échantillon. L'idée est d'utiliser un éclairage incohérent spatialement afin de créer un phénomène de sectionnement optique permettant l'imagerie de tissus épais ainsi que de détails intra-cellulaires ou tissulaires dans le cas d'échantillons fins. On a montré des reconstructions d'échantillons biologiques allant d'une dizaine de microns jusqu'à 80  $\mu\text{m}$  d'épaisseur. On a également pu réaliser des localisations au sein d'éléments tels que des cellules ou des tissus et pu rendre compte de leur structure tridimensionnelle. Les perspectives concernant cette technique sont l'amélioration de la qualité des images pour des tissus épais grâce à de l'optique adaptative afin de pouvoir imager des tissus encore plus épais.

Les prochains travaux qui seront développés sont en lien avec une utilisation de la tomographie apportant un sectionnement axial et permettant de réaliser des tranches optiques de l'échantillon pour réaliser des mesures de masses sèches et de biréfringence de cellules au sein de tissus ou d'éléments intracellulaires pour pouvoir continuer à faire des études de biologie cellulaire dans les tissus.



---

## Description de l'algorithme de segmentation d'images

---

Afin de pouvoir effectuer des mesures de masse sèche de cellules, il est important de pouvoir segmenter chaque cellule avec le moins d'erreur possible quant à la détection de leurs contours.

Cette segmentation est basée sur un algorithme de ligne de partage des eaux. L'algorithme découpe l'image en relief topographique avec des creux et des bosses dont on va simuler progressivement le remplissage avec de l'eau pour définir les différentes limites entre les structures.

### A.1 Détection des cellules par rapport au fond et aplanissement du fond

L'algorithme issu d'une collaboration entre Phasics et l'équipe  $\Phi$ ti de l'Institut Fresnel, segmente une image de différence de chemin optique en faisant l'hypothèse que les cellules visibles sur l'image disposent d'un noyau.

On verra qu'il sera néanmoins possible de segmenter des cellules sans noyau discernable en faisant l'hypothèse que le cytoplasme est très réduit.

La première étape de l'algorithme est la séparation des cellules du fond. Pour détecter la cellule du fond, on calcule l'amplitude du gradient  $G(x, y)$  de l'image dans les directions  $x$  et  $y$ .

Le résultat est une image traduisant les variations locales de la différence de chemin optique. Les zones de plus fortes variations correspondent aux zones de l'image où les cellules sont présentes.

Le logarithme de cette image est appliqué de façon à réduire les dynamiques du gradient (voir Figure A.1(b)). On applique ensuite un seuillage automatique (méthode de *clustering*) de l'image (voir Figure A.1(c)). De façon à supprimer les trous laissés par le seuillage automatique, on applique une dilatation de l'image. Le résultat est présenté Figure A.1(d).

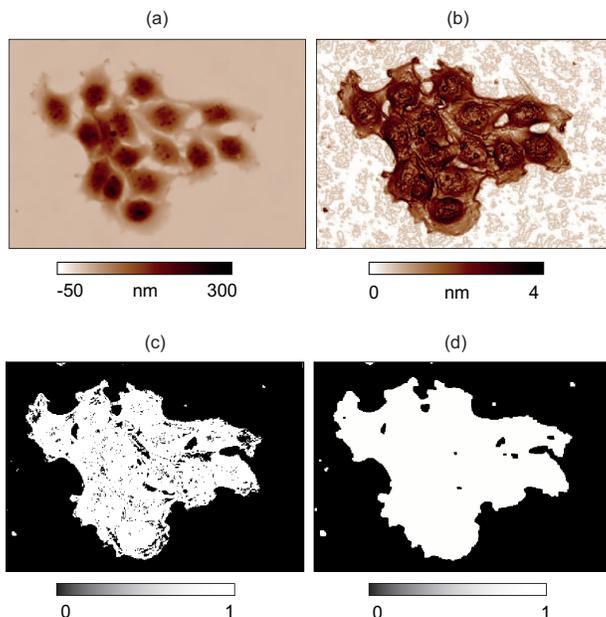


FIGURE A.1 – Segmentation d’une image de différences de chemin optique obtenue sur des cellules COS-7 pour séparer les cellules du fond. (a) Image de différence de chemin optique. (b) Logarithme de l’amplitude du gradient de (a). (c) Seuillage automatique de l’image (b). (d) Dilatation morpho-mathématique de l’image (c), on sépare le fond des cellules.

Le fond de l’image (i.e. correspondant à la zone entre les cellules) peut présenter des inhomogénéités, dues à la non planéité du support par exemple, à basse fréquence qui entraînent une mauvaise évaluation des différences de chemin optiques mesurées. Il est donc nécessaire de réaliser ce que l’on appellera dans la suite un *aplanissement* de ce fond pour obtenir des mesures correctes de volume optique et de masse sèche.

Avant de réaliser la segmentation à proprement parler, un *aplanissement* du fond est effectué afin de corriger ses possibles modulations basses fréquences qui peuvent biaiser la mesure. L’image du fond est projeté sur une base de polynômes de type  $x^n \cdot y^m$  avec  $(n,m) \in \mathfrak{R}$ . Cette approche décrit approximativement les aberrations optiques (ordre 1 : correction du tilt, ordre 2 : correction du defocus et de l’astigmatisme...). On obtient une évaluation du fond que l’on aurait en l’absence de cellules (voir Figure A.2(c)). On peut considérer que la variation basse fréquence sur les images est totalement décorrélée des fréquences spatiales contenues dans les objets d’intérêt.

Le fond estimé et aplani est alors soustrait à l’image de différence de chemin optique.

Les valeurs de médiane et d'écart type du fond sont calculés afin de réaliser une nouvelle segmentation.

Cette seconde segmentation est effectuée sur l' image en considérant comme étant du fond toutes les zones dont la valeur de différence de chemin optique est inférieure à un seuil donné ; les nouvelles zones détectées permettent de retrouver certaines zones de fond non détecté à la première segmentation, notamment les petites zones entre les cellules.

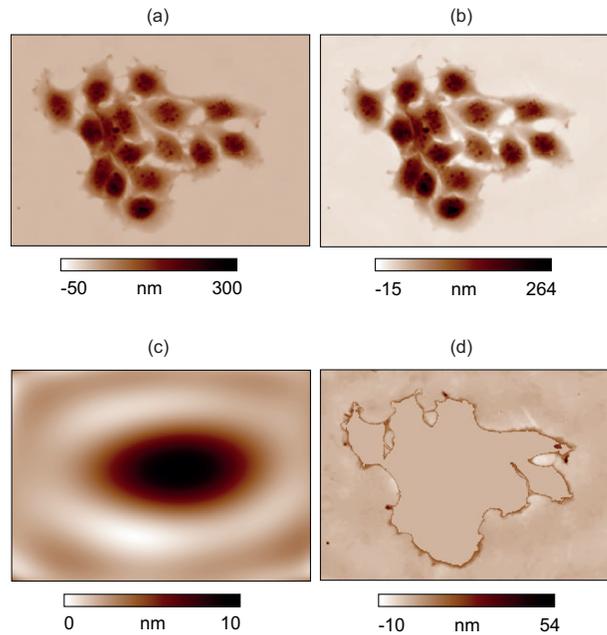


FIGURE A.2 – Illustration de l’aplanissement du fond des images de différences de chemin optique par projection de la zone de fond détecté dans la figure A.1(c) sur une base de polynômes. (a) Image de différence de chemin optique de cellules COS-7. (b) Image (a) après aplanissement du fond. (c) Fond évalué par projection sur une base de polynômes d’ordre 8. (d) Visualisation du fond obtenu après aplanissement.

## A.2 Séparation des différentes cellules de l'image

Il s’agit tout d’abord d’évaluer le nombre de cellules présentes dans l’échantillon. Le principe est d’effectuer un seuillage automatique en détectant les zones les plus déphasantes et qui correspondent aux différents noyaux. (voir Figure A.3(a)). Cette méthode n’est néanmoins pas parfaite. On peut l’améliorer en ajoutant des informations *a priori*, telle que la taille nominale du noyau en  $\mu\text{m}$ , que l’utilisateur entre comme paramètre. L’algorithme détermine alors si les différentes zones détectées par seuillage sont de taille acceptable pour correspondre à une cellule unique. Les zones de surface inférieure à la moitié de la surface nominale sont considérées comme ne pouvant provenir d’une cellule et sont supprimées. Les

zones de taille supérieure à deux fois la surface nominale subissent des érosions successives les amenant progressivement à une taille acceptable. Cette dernière opération permet de séparer les zones de noyaux de cellules se touchant initialement (comme on peut le voir sur l'image [A.3\(c\)](#)).

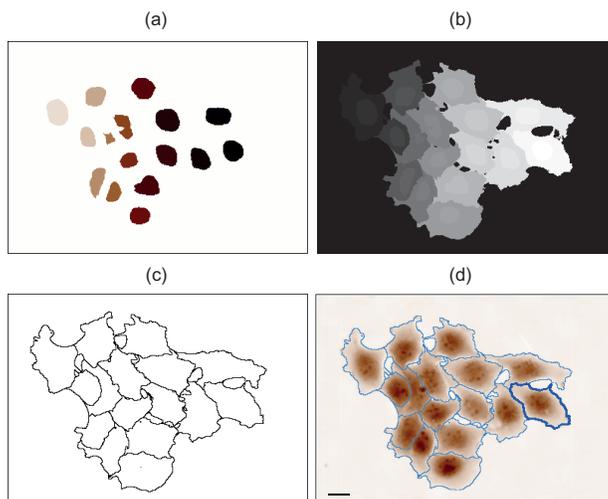


FIGURE A.3 – Segmentation des différentes cellules détectées. (a) Séparation des différents noyaux par érosions successives (b) Séparations des différentes cellules représentées en niveaux de gris. (c) Visualisation des contours des cellules. (d) Résultat de la segmentation finale.

On regroupe ensuite l'information autour des noyaux détectés afin de former les différentes cellules. Chaque pixel de l'image est associé au noyau le plus proche. En combinant les différentes zones autour de chaque noyau avec l'image de séparation entre le fond et les cellules, on obtient une séparation de chaque cellule (voir l'image [A.3\(d\)](#)).

Cet algorithme donne de très bons résultats sans aucune supervision de l'utilisateur. Néanmoins, à trop forte confluence certaines cellules peuvent ne pas être séparées, l'utilisateur peut alors être amené à sélectionner les cellules qu'il souhaite éliminer et à fusionner les cellules coupées.

---

### Etude complémentaire de la levure *S.cerevisiae* sous sa forme haploïde

---

On s'intéresse à la levure *S. cerevisiae* sous sa forme haploïde. L'étude a été menée sur deux échantillons constitué de 307 et 332 levures respectivement en croissance exponentielle et en phase stationnaire.

Une étude de la répartition des levures imagées en fonction du cycle est représentée Figure B.2.

Au niveau de la population cellulaire, de même que pour la forme diploïde, on trouve beaucoup de levures bourgeonnant pleinement et peu de levures en phase de pré-bourgeonnement (Figure B.1(a)) pour des levures se trouvant dans des conditions de croissance exponentielle.

Dans le cas d'une population en état stationnaire, les levures sont majoritairement en pré-bourgeonnement (Figure B.1(a) et Figure B.2) mais la population totale est plus diversifiée que dans le cas de l'espèce diploïde. On voit clairement les différentes répartitions des levures se trouvant dans des phases différentes du cycle commentées plus haut.

On peut noter que le nuage de point est moins dispersé que pour les levures diploïdes observées dans des conditions similaires (coefficients de détermination  $R^2=91\%$  et  $92\%$ ). En comparaison avec les levures en croissance exponentielle, la population en état stationnaire est assez également répartie entre levures qui bourgeonnent pleinement et levures avec petit bourgeon ou sans bourgeon (Figure B.1(a)). On remarque qu'en état stationnaire et croissance exponentielle, il y a globalement plus de levures haploïdes qui bourgeonnent que dans le cas des levures diploïdes.

On synthétise les résultats dans le tableau B.1 et on représente les principaux résultats avec un diagramme de boîtes à moustaches (Figure B.1(c) & (d)).

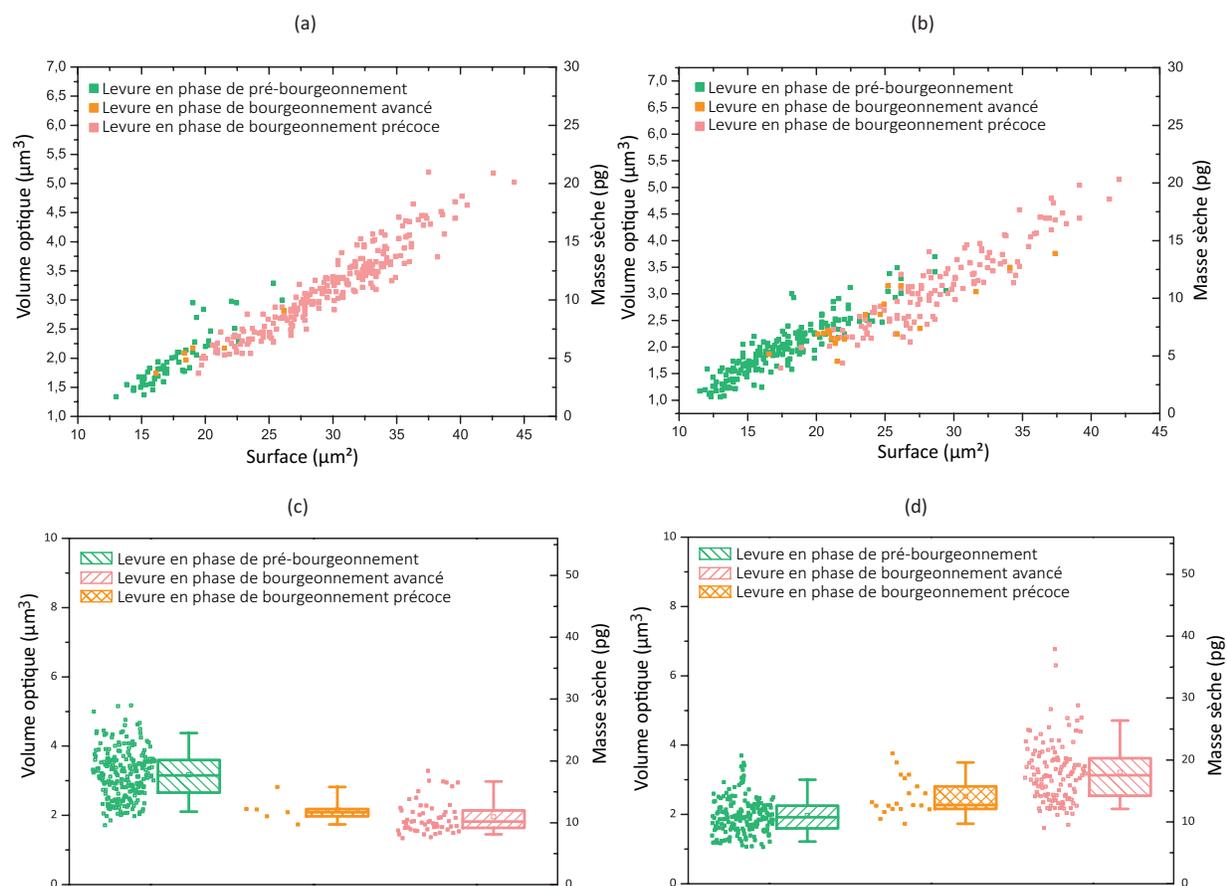


FIGURE B.1 – (a) Volume optique/matière sèche en fonction de la surface de chaque levure d’une population de *S.cerevisiae* haploïde en pré-bourgeoisement (*en carrés verts*), en phase de bourgeoisement précoce (*en carrés oranges*) et pleinement bourgeoisantes (*en carrés roses*) en phases (a) exponentielle et (b) stationnaire. Représentation en diagramme de boîtes à moustaches des populations de *S. cerevisiae* haploïde (c) en croissance exponentielle et (d) en état stationnaire. Les boîtes représentent la médiane (trait centrale), le premier quartile (bas de la boîte), le dernier quartile (haut de la boîte), la moyenne (carré central), le 5<sup>ème</sup> centile (patte du bas) et le 95<sup>ème</sup> centile (patte du haut) des statistiques sur les différentes expériences. Observation avec un objectif 40 $\times$ , ON=0,75. Source blanche filtrée  $\lambda=700 \pm 30$  nm.  $3 \cdot 10^6$  cellules/ml.

On représente la répartition et la variabilité de cette population grâce à l’histogramme Figure B.2 et au diagramme en boîte B.1.

En appliquant le test de Mann Whitney aux populations de levures, on met en évidence une différence significative des valeurs de masse sèche d’un part des levures en phase de pré-bourgeoisement et bourgeoisement précoce, et d’autre part des levures en phase de bourgeoisement précoce et avancé en phases de croissance exponentielle et stationnaire. Ceci atteste du fait que l’on peut différencier ces populations grâce à une mesure de masse

57 / 184 levures	Levures en phase de pré-bourgeoisement		
	Surface ( $\mu\text{m}^2$ )	Volume optique ( $\mu\text{m}^3$ )	Masse sèche (pg)
<b>Moyenne</b>	17,5 / 17,5	2,0 / 2,0	10,9 / 10,9
<b>Médiane</b>	16,8 / 17,1	1,8 / 1,9	10,1 / 10,7
<b>Ecart type</b>	2,8 / 3,6	0,5 / 0,5	2,6 / 2,9
7 / 20 levures	Levures en phase de bourgeoisement précoce		
	Surface (micro $\text{m}^2$ )	Volume optique ( $\mu\text{m}^3$ )	Masse sèche (pg)
<b>Moyenne</b>	18,8 / 24,4	2,0 / 2,5	11,2 / 14,0
<b>Médiane</b>	18,5 / 22,8	2,1 / 2,3	11,6 / 12,7
<b>Ecart type</b>	4,3 / 5,1	0,5 / 0,5	2,9 / 3,0
243 / 128 levures	Levures en phase de bourgeoisement avancé		
	Surface ( $\mu\text{m}^2$ )	Volume optique ( $\mu\text{m}^3$ )	Masse sèche (pg)
<b>Moyenne</b>	29,8 / 29,4	3,2 / 3,2	17,9 / 17,9
<b>Médiane</b>	30,1 / 28,7	3,2 / 3,1	17,7 / 17,4
<b>Ecart type</b>	5,1 / 5,1	0,7 / 0,9	4,1 / 4,80

Tableau B.1 – Synthèse des résultats de la mesure de masse sèche des 3 populations de *S.cerevisiae* haploïdes en phase de croissance exponentielle (en noir) et stationnaire (en bleu).

sèche.

L'étude du volume des bourgeons des 2 populations de levures haploïdes est illustré Figure B.3. De la même façon que précédemment, on voit que les bourgeons sont plus gros d'en moyenne 10% lorsque la population est en croissance exponentielle.

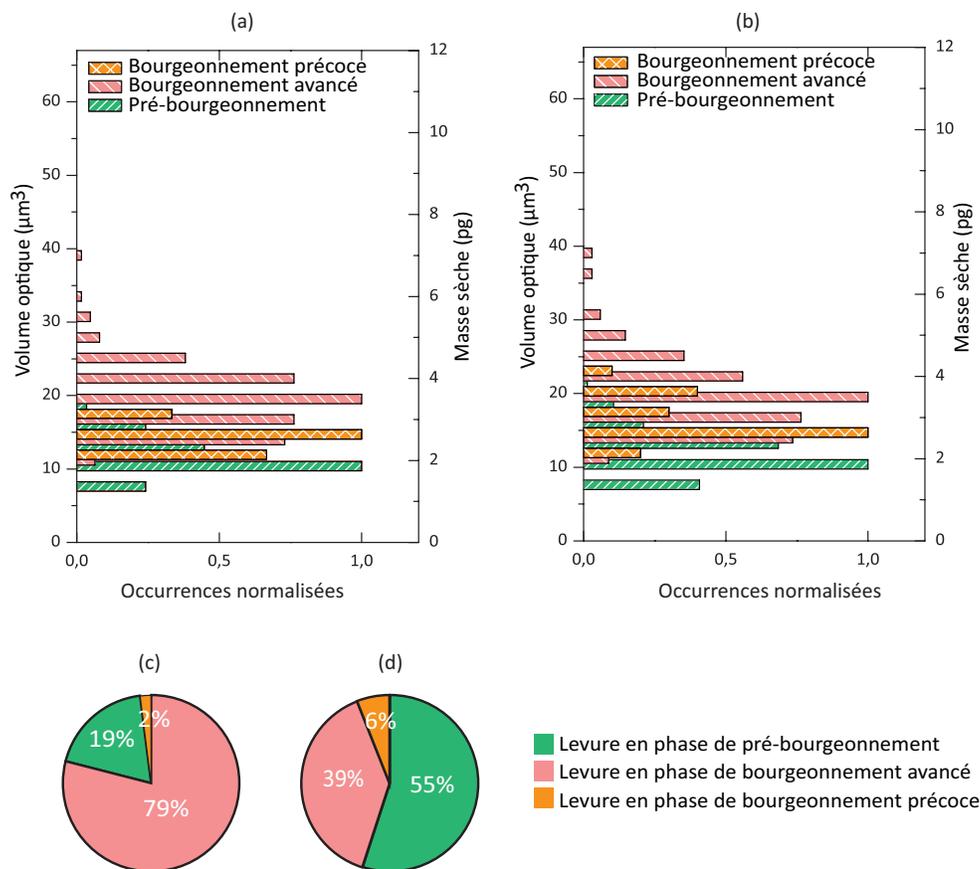


FIGURE B.2 – Histogramme des mesures de *S. cerevisiae* haploïdes en culture (a) exponentielle et (b) phase stationnaire avec occurrences normalisées. Répartition (c) des 307 levures haploïdes en croissance exponentielle et (d) des 332 levures haploïdes en phase stationnaire en fonction de leur phase au sein du cycle.

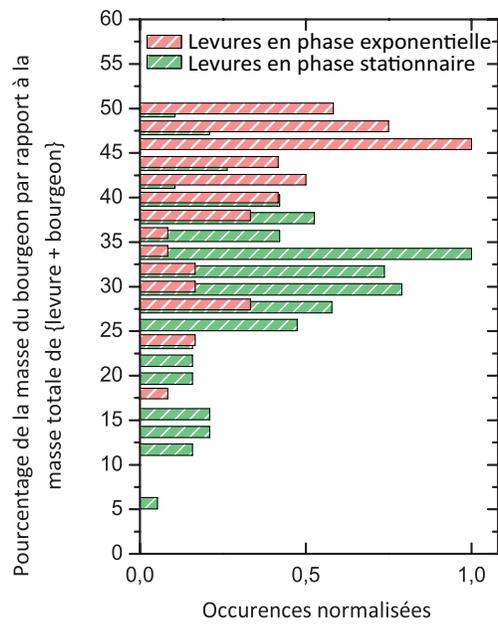


FIGURE B.3 – Histogramme de comparaison de la masse occupée par le bourgeon de levures haploïdes dans des conditions de croissance différentes avec occurrences normalisées.



# Enhanced 3D spatial resolution in quantitative phase microscopy using spatially incoherent illumination

Pierre Bon,<sup>1,3,\*</sup> Sherazade Aknoun,<sup>1,2</sup> Serge Monneret,<sup>1</sup>  
and Benoit Wattellier<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Aix-Marseille Université, Ecole Centrale Marseille, CNRS, Institut Fresnel, Campus de Saint-Jérôme, 13013 Marseille, France

<sup>2</sup>PHASICS SA, XTEC Bat. 404, Campus de l'Ecole Polytechnique, Route de Saclay, 91128 Palaiseau, France

<sup>3</sup>Currently at Institut Langevin, ESCPI Paris-Tech, CNRS, 1 rue Jussieu, Paris, France

\*[pierre.bon@fresnel.fr](mailto:pierre.bon@fresnel.fr)

**Abstract:** We describe the use of spatially incoherent illumination to make quantitative phase imaging of a semi-transparent sample, even out of the paraxial approximation. The image volume electromagnetic field is collected by scanning the image planes with a quadriwave lateral shearing interferometer, while the sample is spatially incoherently illuminated. In comparison to coherent quantitative phase measurements, incoherent illumination enriches the 3D collected spatial frequencies leading to 3D resolution increase (up to a factor 2). The image contrast loss introduced by the incoherent illumination is simulated and used to compensate the measurements. This restores the quantitative value of phase and intensity. Experimental contrast loss compensation and 3D resolution increase is presented using polystyrene and TiO<sub>2</sub> micro-beads. Our approach will be useful to make diffraction tomography reconstruction with a simplified setup.

© 2014 Optical Society of America

**OCIS codes:** (110.0180) Microscopy; (120.5050) Phase measurement; (110.6880) Three-dimensional image acquisition; (110.1650) Coherence imaging; (050.1960) Diffraction theory.

---

## References and links

1. E. Cuche, P. Marquet, and C. Depeursinge, "Simultaneous amplitude-contrast and quantitative phase-contrast microscopy by numerical reconstruction of fresnel off-axis holograms," *Appl. Opt.* **38**, 6994–7001 (1999).
2. G. Popescu, L. P. Deflores, J. C. Vaughan, K. Badizadegan, H. Iwai, R. R. Dasari, and M. S. Feld, "Fourier phase microscopy for investigation of biological structures and dynamics," *Opt. Lett.* **29**, 2503–2505 (2004).
3. M. Debailleul, V. Georges, B. Simon, R. Morin, and O. Haeberlé, "High-resolution three-dimensional tomographic diffractive microscopy of transparent inorganic and biological samples," *Opt. Lett.* **34**, 79–81 (2009).
4. B. Kemper, A. Vollmer, C. E. Rommel, J. Schnekenburger, and G. von Bally, "Simplified approach for quantitative digital holographic phase contrast imaging of living cells," *J. Biomed. Opt.* **16**, 026014 (2011).
5. Y. Choi, T. D. Yang, K. J. Lee, and W. Choi, "Full-field and single-shot quantitative phase microscopy using dynamic speckle illumination," *Opt. Lett.* **36**, 2465–2467 (2011).
6. N. T. Shaked, "Quantitative phase microscopy of biological samples using a portable interferometer," *Opt. Lett.* **37**, 2016–2018 (2012).
7. B. Bhaduri, K. Tangella, and G. Popescu, "Fourier phase microscopy with white light," *Biomed. Opt. Express* **4**, 1434–1441 (2013).
8. A. Barty, K. A. Nugent, D. Paganin, and A. Roberts, "Quantitative optical phase microscopy," *Opt. Lett.* **23**, 817–819 (1998).

9. S. S. Kou, L. Waller, G. Barbastathis, and C. J. R. Sheppard, "Transport-of-intensity approach to differential interference contrast (ti-dic) microscopy for quantitative phase imaging," *Opt. Lett.* **35**, 447–449 (2010).
10. K. G. Phillips, S. L. Jacques, and O. J. T. McCarty, "Measurement of single cell refractive index, dry mass, volume, and density using a transillumination microscope," *Phys. Rev. Lett.* **109**, 118105 (2012).
11. S. Bernet, A. Jesacher, S. Fürhapter, C. Maurer, and M. Ritsch-Marte, "Quantitative imaging of complex samples by spiral phase contrast microscopy," *Opt. Express* **14**, 3792–3805 (2006).
12. Z. Wang, L. Millet, M. Mir, H. Ding, S. Unarunotai, J. Rogers, M. U. Gillette, and G. Popescu, "Spatial light interference microscopy (slim)," *Opt. Express* **19**, 1016–1026 (2011).
13. M. R. Arnison, K. G. Larkin, C. J. R. Sheppard, N. I. Smith, and C. J. Cogswell, "Linear phase imaging using differential interference contrast microscopy," *J. Microsc.* **214**, 7–12 (2004).
14. D. D. Duncan, D. G. Fischer, A. Dayton, and S. A. Prahl, "Quantitative carré differential interference contrast microscopy to assess phase and amplitude," *J. Opt. Soc. Am. A* **28**, 1297–1306 (2011).
15. P. Bon, G. Maucort, B. Wattellier, and S. Monneret, "Quadriwave lateral shearing interferometry for quantitative phase microscopy of living cells," *Opt. Express* **17**, 13080–13094 (2009).
16. I. Iglesias, "Pyramid phase microscopy," *Opt. Lett.* **36**, 3636–3638 (2011).
17. A. B. Parthasarathy, K. K. Chu, T. N. Ford, and J. Mertz, "Quantitative phase imaging using a partitioned detection aperture," *Opt. Lett.* **37**, 4062–4064 (2012).
18. M. Born and E. Wolf, *Principles of Optics* (Cambridge University, 1999), chap. 9, pp. 547–553.
19. N. Streibl, "Three-dimensional imaging by a microscope," *J. Opt. Soc. Am. A* **2**, 121–127 (1985).
20. J. Primot and N. Guérineau, "Extended hartmann test based on the pseudoguiding property of a Hartmann mask completed by a phase chessboard," *Appl. Opt.* **39**, 5715–5720 (2000).
21. P. Bon, S. Monneret, and B. Wattellier, "Noniterative boundary-artifact-free wavefront reconstruction from its derivatives," *Appl. Opt.* **51**, 5698–5704 (2012).
22. P. Bon, B. Wattellier, and S. Monneret, "Modeling quantitative phase image formation under tilted illuminations," *Opt. Lett.* **37**, 1718–1720 (2012).
23. P. Bon, T. Barroca, S. Lévêque-Fort, and E. Fort, "Label-free evanescent microscopy for membrane nanotomography in living cells," *J. Biophotonics* (advance online publication, 2013).
24. V. Lauer, "New approach to optical diffraction tomography yielding a vector equation of diffraction tomography and a novel tomographic microscope," *J. Microsc.* **205**, 165–176 (2002).
25. S. S. Kou and C. J. R. Sheppard, "Imaging in digital holographic microscopy," *Opt. Express* **15**, 13640–13648 (2007).
26. T. Kim, R. Zhou, M. Mir, S. D. Babacan, P. S. Carney, L. L. Goddard, and G. Popescu, "White-light diffraction tomography of unlabelled live cells," *Nat. Photonics*, advance online publication (2014).
27. F. Montfort, T. Colomb, F. Charrière, J. Kühn, P. Marquet, E. Cucho, S. Herminjard, and C. Depeursinge, "Submicrometer optical tomography by multiple-wavelength digital holographic microscopy," *Appl. Opt.* **45**, 8209–8217 (2006).
28. S. S. Kou and C. J. R. Sheppard, "Image formation in holographic tomography: high-aperture imaging conditions," *Appl. Opt.* **48**, H168–H175 (2009).
29. R. Fiolka, K. Wicker, R. Heintzmann, and A. Stemmer, "Simplified approach to diffraction tomography in optical microscopy," *Opt. Express* **17**, 12407–12417 (2009).
30. W. J. Choi, D. I. Jeon, S.-G. Ahn, J.-H. Yoon, S. Kim, and B. H. Lee, "Full-field optical coherence microscopy for identifying live cancer cells by quantitative measurement of refractive index distribution," *Opt. Express* **18**, 23285–23295 (2010).
31. Y. Cotte, F. Toy, P. Jourdain, N. Pavillon, D. Boss, P. Magistretti, P. Marquet, and C. Depeursinge, "Marker-free phase nanoscopy," *Nat. Photonics* **7**, 113–117 (2013).
32. P. Gao, G. Pedrini, and W. Osten, "Structured illumination for resolution enhancement and autofocusing in digital holographic microscopy," *Opt. Lett.* **38**, 1328–1330 (2013).
33. S. Chowdhury and J. Izatt, "Structured illumination quantitative phase microscopy for enhanced resolution amplitude and phase imaging," *Biomed. Opt. Express* **4**, 1795–1805 (2013).
34. X. Chen, N. George, G. Agranov, C. Liu, and B. Gravelle, "Sensor modulation transfer function measurement using band-limited laser speckle," *Opt. Express* **16**, 20047–20059 (2008).
35. Y. Cotte, F. M. Toy, C. Arfire, S. S. Kou, D. Boss, I. Bergoënd, and C. Depeursinge, "Realistic 3d coherent transfer function inverse filtering of complex fields," *Biomed. Opt. Express* **2**, 2216–2230 (2011).
36. A. Tikhonov, A. Goncharsky, V. Stepanov, and A. Yagola, *Numerical Methods for the Solution of Ill-Posed Problems*, Mathematics and Its Applications (Springer, 1995).
37. N. Wiener, *Extrapolation, Interpolation, and Smoothing of Stationary Time Series* (The MIT Press, 1964).
38. Y. Sung, W. Choi, C. Fang-Yen, K. Badizadegan, R. R. Dasari, and M. S. Feld, "Optical diffraction tomography for high resolution live cell imaging," *Opt. Express* **17**, 266–277 (2009).
39. P. Bon, B. Rolly, N. Bonod, J. Wenger, B. Stout, S. Monneret and H. Rigneault, "Imaging the Gouy phase shift in photonic jets with a wavefront sensor," *Opt. Lett.* **37**, 3531–3533 (2012).
40. R. Barer, "Interference microscopy and mass determination," *Nature* **169**, 366–367 (1952).
41. S. Aknoun, P. Bon, J. Savatier, B. Wattellier, and S. Monneret, "Quantitative birefringence imaging of biological

## 1. Introduction

Optical microscopy has been widely used for hundred of years for bio-medical imaging. However, most of nonmodified biological samples are transparent at optical wavelengths, leading to low-contrast images when using a conventional intensity-sensitive sensor on a microscope. However, even if the sample does not absorb light, it presents a refractive index distribution that perturbs the wave front and can be used as an intrinsic source of contrast. Quantitative phase imaging (QPI) is thus a useful tool to observe biological sample. Several quantitative techniques have been developed in the past two decades and various approaches can be listed: Mach-Zender or Michelson design [1–7], transport of intensity equations [8–10], phase engineering in the pupil [11, 12], quantitative differential interference contrast [13, 14] or self-interference phenomenon [15–17].

Quantitative phase imaging is commonly used with coherent illumination because it allows a relatively simple interpretation of the measurement, but the drawback is that it also generates speckle distribution in the images. Only a few techniques can deal with a low temporal coherent source [6, 7, 9, 11, 13, 15, 17] or with a partially spatially incoherent illumination (SII) [5, 10, 15–17] without suffering from reconstruction artifacts. However, going from coherent illumination to incoherent illumination (particularly SII) is an important feature for both signal-to-noise ratio and resolution purpose. Indeed, the lateral resolution is doubled by aperture synthesis effect between coherent spatial illumination and incoherent spatial illumination. The axial-resolution gain is even higher as it has been shown in tomographic setups [3].

In this paper we propose to study quantitative phase imaging under any illumination spatial coherence using a quadriwave lateral shearing interferometer (QWLSI) [15]. We consider an approach which is valid not only within the paraxial approximation [10] but for any collection numerical aperture ( $NA_{coll}$ ) and illumination numerical aperture ( $NA_{ill}$ ). The approach is based on SII contrast loss determination and compensation to obtain quantitative analysis from measurements. The modulation transfer function (MTF) describes this contrast loss as a function of the object spatial frequencies. Theoretical MTF is well known in conventional intensity imaging setup [18] because it allows quantitative interpretation of the measurements. It can be generalized in 3D and also for phase-sensitive imaging setup [19]. We propose in this paper a simulation method to determine the MTF of the couple microscope / QWLSI for both intensity and optical path difference (OPD). MTF are discussed under both the projective approximation (equivalent to a 2D MTF) and the complete 3D mapping. We then compare the simulated incoherent images with experimental ones. We finally validate our approach with point-like objects and show that this technique drastically increases phase and intensity image 3D-resolution.

## 2. Setup for QWLSI measurements under spatially incoherent illumination

### 2.1. Optical setup

We use a nonmodified inverted microscope (Ti-U, Nikon, Japan) equipped with a Z-axis piezo stage (PiFoc, Physik Instrumente, Germany) to allow stack imaging and a  $100\times$ ,  $NA_{coll} = 1.3$  objective (Nikon, Japan). To generate an incoherent trans-illumination, the native halogen source of the microscope is used. The white-light is filtered using a  $700 \pm 30$  nm band-pass filter in order to neglect both the wavelength dependency of the 2D/3D MTF and the sample dispersion.

In order to tune the illumination spatial coherence, an oil immersion condenser ( $NA_{ill}=1.4$ , Nikon, Japan) is used. This makes our source completely tunable regarding the spatial coherence. Indeed, by closing the aperture diaphragm, the illumination numerical aperture  $NA_{ill} \rightarrow 0$

and thus the illumination is close to a collimated plane-wave (*i.e.* a spatially coherent illumination). On the opposite, by opening the aperture diaphragm, the illumination numerical aperture can be set to  $NA_{ill} = NA_{coll} = 1.3$ , *i.e.* a so-called fully SII [18]. Figure 1 shows the setup scheme.

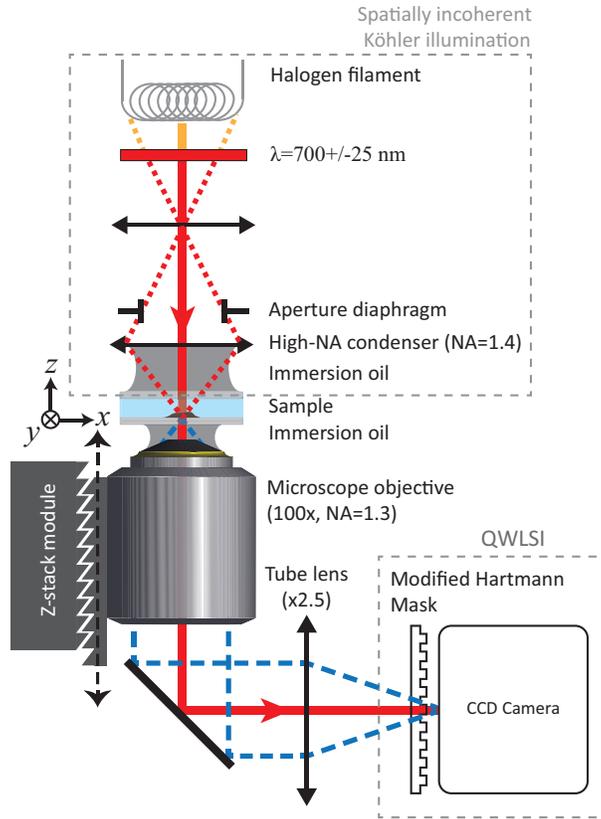


Fig. 1. Schematic of the optical setup used in this paper.

The sample is imaged onto a commercial QWLSI (SID4Bio, Phasics, France), composed of a Modified Hartmann Mask (MHM [20]) and a CCD camera. A tube lens  $\times 2.5$  is used in order both to perfectly sample the images (Nyquist criterion) and to have a well contrasted QWLSI interferogram even when the illumination numerical aperture is equal to the collection one (*i.e.* Full spatially incoherent illumination). A further discussion about this point is made in the following section.

## 2.2. Quantitative phase imaging under incoherent illumination

In this part, we propose to discuss what can be extracted from a QWLSI interferogram under coherent plane-wave illumination and what is obtained when the same algorithm is applied to an incoherent superposition of interferograms.

Under a plane wave illumination, QWLSI allows to retrieve both the electromagnetic (EM) field intensity and its OPD gradients along two orthogonal image-space directions  $x$  and  $y$ . After numerical integration, the OPD is retrieved in a quantitative way [21].

More precisely, in the scope of phase imaging with a plane-wave illumination, the OPD can be described as follows [22]:

$$OPD \approx \int_{sample} \Delta n \times \frac{dz}{\cos\left(\left|\vec{\theta}_{ill}\right|\right)}, \quad (1)$$

where  $\Delta n$  is the local refractive index difference between the sample and the surrounding medium,  $\vec{\theta}_{ill}$  the illumination angle and  $z$  the optical axis. For sake of simplicity and readability, we develop our next reasoning in one transverse dimension  $x$ , as the extension to two transverse dimensions is straightforward. Under a plane-wave electromagnetic (EM) field  $\sqrt{I} \cdot e^{\frac{2j\pi}{\lambda} \cdot OPD} \cdot e^{2j\pi \cdot \text{Tilt}}$  of wavelength  $\lambda$ , the interferogram  $i$  generated by a QWLSI on a sensor can be written, in one dimension, as follows :

$$i\left(\vec{\theta}_{ill}, x, z\right) \approx I\left(\vec{\theta}_{ill}, x, z\right) \left[1 + \cos\left(\frac{2\pi}{\Lambda} \left[x - z_p \frac{\partial OPD}{\partial x}\left(\vec{\theta}_{ill}, x, z\right) - z_p \cdot \tau\left(\vec{\theta}_{ill}\right)\right]\right)\right], \quad (2)$$

where  $I$  is the EM field intensity,  $\Lambda$  is the diffraction grating period,  $z_p$  the distance between the diffraction grating and the sensor,  $\tau$  the wavefront tilt component due to the illumination angle at the sensor level (see Eq. (5)) and  $z$  the position of the sensor along the optical axis. Let us note  $\alpha = 2\pi z_p / \Lambda$  the calibration lever arm. By demodulating around the  $0^{th}$  order spatial frequency and around the  $\Lambda$  spatial frequency, one can extract respectively  $I$  and the OPD gradient along  $x$  by considering :

$$\left\{ \begin{array}{l} I = \text{FT}^{-1} [\text{FT}[i] \otimes \delta(k)] \\ \frac{\partial OPD}{\partial x} = \frac{1}{\alpha} \text{Arg} \left\{ \text{FT}^{-1} [\text{FT}[i] \otimes \delta\left(k - \frac{\Lambda}{2\pi}\right)] \right\} \end{array} \right\}, \quad (3)$$

where  $\delta$  is the Dirac distribution,  $\text{Arg}$  the complex argument function,  $\text{FT}$  the Fourier transform and  $\text{FT}^{-1}$  the inverse Fourier transform. Please note that to obtain individual images for intensity and OPD gradients, a low-pass filtering is also applied by Fourier space clipping around  $k = 0$  and  $k = \Lambda/2\pi$ .

Considering now an incoherent illumination, the obtained interferogram  $i_{SI}$  with QWLSI is equal to the sum of each unit interferogram formed by each source point :

$$i_{SI}(x, z) = \int_{\vec{\theta}_{ill}} i\left(\vec{\theta}_{ill}, x, z\right) d\vec{\theta}_{ill}. \quad (4)$$

It is well known that wave front dividing interferometers (such as QWLSI) suffer from interferogram blur when the source is not a point. Indeed, as each unit interferogram has a different tilt value, it is laterally shifted on the sensor with respect to the others. This tilt component at the QWLSI level can be written [15]:

$$\tau\left(\vec{\theta}_{ill}\right) = \frac{\tan\left(\left|\vec{\theta}_{ill}\right|\right)}{M}, \quad (5)$$

where  $M$  is the microscope magnification. Using high lateral magnification between the object and the image space leads to a huge reduction of the angular dispersion in the image space. So, even for totally incoherent illumination in the object plane, it is possible to obtain a well contrasted interferogram by using a high-magnification between the object and the QWLSI plane [15]. As an example, Fig. 2 shows interferograms obtained by imaging at  $250\times$  magnification the same polystyrene microbead using the setup of Fig. 1(a). In Fig. 2(a), a spatially coherent source (halogen source and Köhler aperture diaphragm closed to the minimum) has been used, whereas spatially incoherent source (halogen source and Köhler aperture diaphragm opened to reach  $\text{NA}_{illum} = \text{NA}_{coll} = 1.3$ ) has been used in Fig. 2(b).

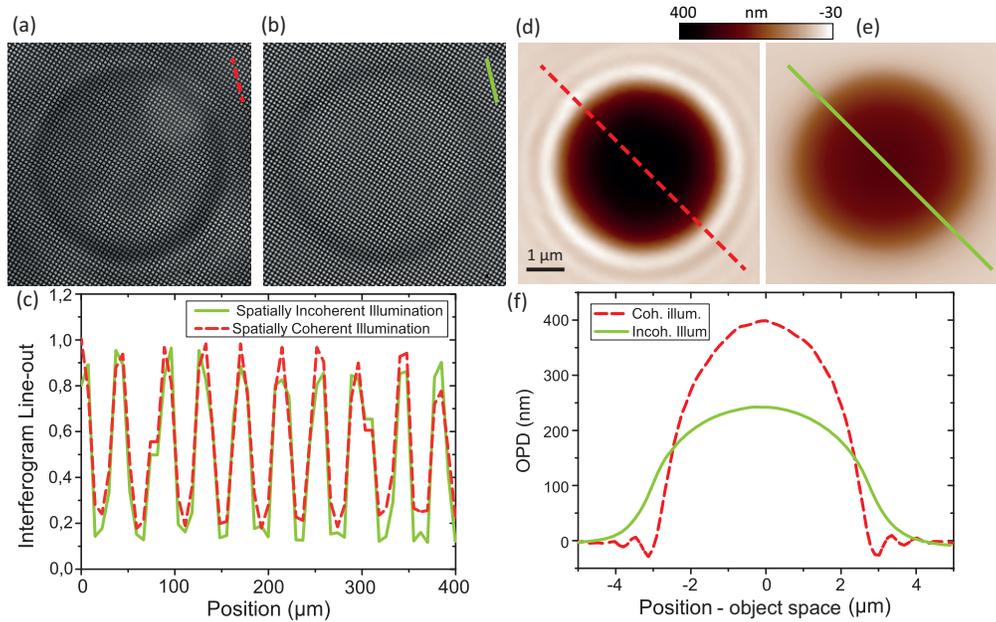


Fig. 2. 5  $\mu\text{m}$  polystyrene microbead immersed in a  $n = 1.556$  medium, imaged at  $250\times$ ,  $\text{NA}_{\text{coll}} = 1.3$ . (a) QWLSI interferogram with  $\text{NA}_{\text{illum}} \approx 0.08$ . (b) QWLSI interferogram with  $\text{NA}_{\text{illum}} = 1.3$ . (c) Profile plots of (a) (dashed red line) and (b) (solid black line). (d) OPD image retrieved from (a). (e) OPD image retrieved from (b). (f) Profile plots of (d) (dashed red line) and (e) (solid black line).

The interferogram contrast is close to unity for both coherent and incoherent illuminations (Fig. 2(c)). Local contrast analysis gives an average fringe contrast of 0.88 for the coherent illumination (theoretical value = 1) and of 0.85 for the incoherent illumination (theoretically 0.89 as calculated using [15]).

Although perfectly well contrasted, the interferograms under coherent illumination and SII analyzed with the same algorithm (*i.e.* demodulation according to Eq. (3) and gradient integration [21]) lead to different OPD results. This is perfectly visible on Figs. 2(d) and 2(f): SII imaging leads to a decrease in the OPD ( $OPD_{\text{SII}}^{\text{max}} = 0.6 \cdot OPD_{\text{coh}}^{\text{max}}$ ); this effect will be discussed in the part 3.3.

To sum up, SII induces thus two different effects: fringe blurring and OPD amplitude reduction. In our case, we demonstrated that the OPD amplitude reduction is the dominant effect. Moreover, please note that the SII intensity and OPD fields are not rigorously the phase and the intensity of an existing EM field as these notions are dedicated to coherent fields.

### 3. Effect of the illumination coherence on the image formation

#### 3.1. Scalar model and effect of polarization

In this paper we propose an EM field scalar description that neglects any polarization effect. As we work with non-polarized illumination / detection and with sub-critical angles only [23], this assumption is valid in first approach for this entire paper. Polarization effect may affect the model at second order and explain some residual mismatches between the theoretical model and the experiment.

Moreover, for studies with polarized light at high-numerical aperture or if the objective nu-

merical aperture is higher than the medium refractive index (*i.e.* evanescent wave are collected), a vector approach will be necessary to take into account the influence of polarization on the microscope optical response. However, these kind of studies are beyond the scope of this paper.

### 3.2. Resolution improvement

The image formation on a sensor is directly related to the questions of both lateral and axial resolution (also known as sectioning). In the context of scattering microscopy, the lateral resolution is well known and described for more than hundred of years. According to Abbe's formula, the lateral unpolarized resolution  $r_{xy}$  of a perfect microscope is equal to:

$$r_{xy} = \frac{\lambda_0}{\text{NA}_{ill} + \text{NA}_{coll}}, \quad (6)$$

where  $\lambda_0$  is the free-space wavelength of the light,  $\text{NA}_{ill}$  is the numerical aperture of the illumination and  $\text{NA}_{coll}$  is the numerical aperture on the collection (*i.e.* the objective numerical aperture). From this equation, one can notice that, for a given microscope objective, both the wavelength and the angular content of the illumination contribute to the lateral resolution. It has to be noticed that for unpolarized fluorescence imaging, where the image is formed by the incoherent re-emission of light, the same formula is used considering that  $\text{NA}_{ill} = \text{NA}_{coll}$ .

The coherence of the illumination beam is thus a key point in scattering imaging. Indeed, as the scattered EM field is completely related with the incident EM field, it is essential to know the illumination scheme. It is convenient to consider any incoherent illumination as the superposition of coherent plane-waves. In the case of semi-transparent object imaging, the interaction between the object and the coherent light can be described as follows :

$$\vec{k}_d = \vec{k}_i + \vec{K}_o, \quad (7)$$

where  $\vec{k}_i$  is the wave-vector of the incident plane wave,  $\vec{k}_d$  is a diffracted wave-vector and  $\vec{K}_o$  is an object 3D spatial frequency. As the scattering is an elastic process,  $\|\vec{k}_i\| = \|\vec{k}_d\|$  and:

$$k_i^2 = (k_{ix} + K_{ox})^2 + (k_{iy} + K_{oy})^2 + (k_{iz} + K_{oz})^2. \quad (8)$$

So the locus of the accessible object frequencies is a sphere of center  $(k_{ix}, k_{iy}, k_{iz})$  and of radius  $k_i$ . This sphere is called the Ewald sphere [24, 25] and is well known in the scope of crystallography. The accessible object frequencies can be decomposed in two solutions:

$$\begin{cases} K_{oz} = -k_{iz} + \sqrt{k_{iz}^2 - (K_{ox}^2 + K_{oy}^2 + 2 \cdot K_{ox} \cdot k_{ix} + 2 \cdot K_{oy} \cdot k_{iy})} & [1] \\ K_{oz} = -k_{iz} - \sqrt{k_{iz}^2 - (K_{ox}^2 + K_{oy}^2 + 2 \cdot K_{ox} \cdot k_{ix} + 2 \cdot K_{oy} \cdot k_{iy})} & [2] \end{cases} \quad (9)$$

The solution 1 corresponds to the accessible object frequencies when the illumination/detection scheme is in transmission (*i.e.* trans-illumination scheme) and the solution 2 corresponds to the frequencies when the illumination/detection is in reflection. For the remaining of this paper, the case of trans-illumination only will be considered. Figure 3(a) presents an example of the measurable object frequencies in trans-illumination, in the case of an illumination plane-wave propagating along the  $(K_{oz})$  axis. Due to the collection numerical aperture, the spatial object frequencies that can be retrieved from each spatially coherent illumination is thus a fraction of the Ewald sphere. An example of accessible object frequencies with trans-illumination and plane-wave illumination is presented in Fig. 3(b), considering an immersion objective (immersion refractive index  $n_{imm}$ ,  $\text{NA}_{coll} = 0.75\lambda_m/\lambda_0$ , with  $\lambda_m = \lambda_0/n_{imm}$ ).

Considering now an incoherent illumination and again a trans-illumination scheme, the accessible object frequencies are the union of all the Ewald sphere portions accessible by each

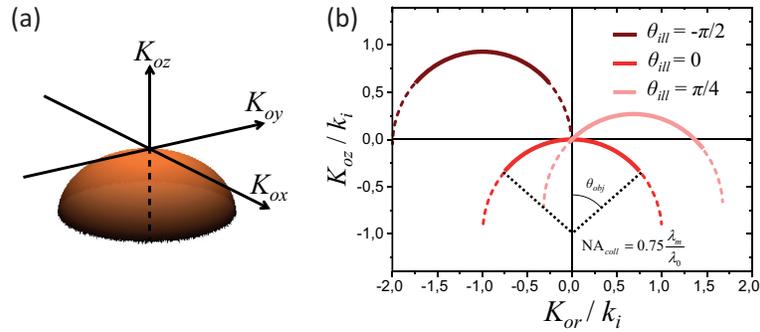


Fig. 3. Measurable object frequencies in trans-illumination when illuminated by a plane wave propagating: (a) along the ( $K_{oz}$ ) axis. (b) along the optical axis (red curve), with an angle respect to the optical axis off  $\pi/4$  (pink curve) and with an angle of  $-\pi/2$  (brown). The dashed dot regions indicate the frequencies filtrated by the collection microscope objective of numerical aperture  $NA_{coll} = 0.75 \frac{\lambda_m}{\lambda_0}$ .

unit plane wave constituting the incoherent source decomposition. The object frequency support can thus be greatly improved compared with coherent illumination. At this point polychromatic incoherent source (ex. white LED) and spatially incoherent source (ex. wavelength filtered halogen, such as in this paper) have to be considered separately.

#### Polychromatic incoherent illumination

Figure 4(a) shows the accessible object frequencies for a polychromatic source with a maximum wavelength equal to  $2 \times$  the minimum wavelength (equivalent to a visible light spectrum); the average wavelength is called  $\langle \lambda \rangle$  and its associated wave-vector  $\langle k_i \rangle$ . The numerical aperture is the same as the one in Fig. 3(b):  $NA_{coll} = 0.75 \lambda_m / \lambda_0$ .

In trans-illumination, the lateral resolution of polychromatic imaging is the one given by the shortest wavelength of the spectrum: thus, there is no real gain in lateral resolution. However, the 3D accessible object frequencies (in green in Fig. 4(a)) are extended compared with monochromatic imaging: the diffraction rings observed in coherent images are reduced which slightly improves the image quality [26]. The axial resolution is also improved in trans-illumination but the effect is much more important in reflection [25] allowing, for example in conventional diffraction tomography, an approximated tomographic reconstruction [27].

#### Spatially incoherent illumination, SII

Figure 4(b) shows the support of accessible object frequencies considering a fully SI illumination [18] of numerical aperture  $NA_{ill} = NA_{coll}$  and of wavelength  $\langle \lambda \rangle$ .

The frequency support under incoherent illumination is the same as the one obtained in diffraction tomography, where a series of coherent illumination are sent on the sample and numerically combined [3, 25, 28].

SI illumination allows a much more interesting gain in trans-illumination compared to polychromatic incoherent illumination. The lateral resolution can be doubled compared to the coherent illumination when the illumination numerical aperture is equal to the collection numerical aperture (Eq. (6) and Fig. 4(b) in green). This is the so-called aperture synthesis effect. The axial resolution is also increased, leading to axial sectioning. It has been widely used, for example, in conventional diffraction tomography [3, 24, 29–31]. The axial sectioning can be understood as follows. Each unit illumination is spreading the out-of-focus volume along a specific and given direction: the consequence with SII is a blurred information for out-of-focus planes. In

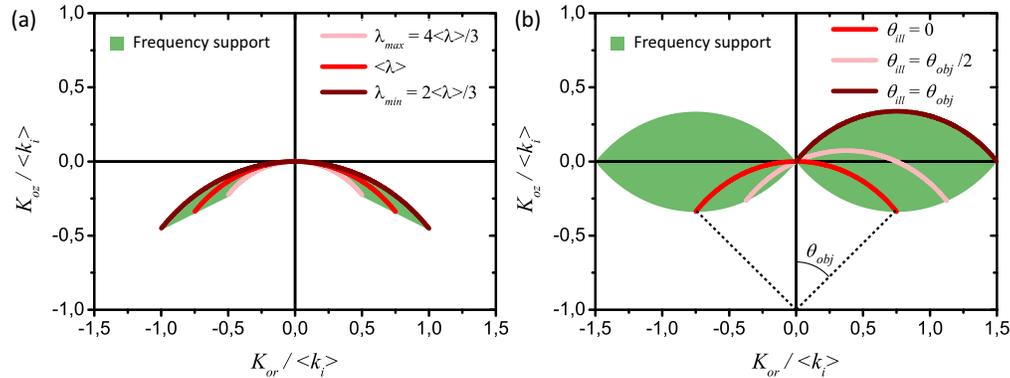


Fig. 4. Measurable object frequencies with an objective of  $NA_{coll} = 0.75\lambda_m/\lambda_0$ , trans-illuminated by a incoherent source. (a) Polychromatic spatially coherent illumination with  $\lambda_{max} = 2\lambda_{min}$ . In pink: coherent contribution at  $\lambda_m = \lambda_{max}$ , in red: at  $\lambda_m = \langle\lambda\rangle$ , in brown: at  $\lambda_m = \lambda_{min}$ . In green: complete accessible frequencies. (b) Monochromatic ( $\lambda_m = \langle\lambda\rangle$ ) spatially incoherent illumination with  $NA_{ill} = NA_{coll}$ . In red: coherent contribution at  $\theta_{ill} = 0$ , in pink: at  $\theta_{ill} = \theta_{obj}/2$ , in brown: at  $\theta_{ill} = \theta_{obj}$ . In green: complete accessible frequencies.

the same time the in-focus plane does not spread for any unit illumination. This explains the local high contrast and out-of-focus rejection obtained on the SII image.

The accessible frequencies under SII form the so-called peanut-shaped structure, where the frequencies along the optical axis can not be reconstructed (the *missing apple core* [3]). It is interesting to mention here that under fully SI illumination (when the illumination numerical aperture is equal to the collection numerical aperture) the lateral resolution is theoretically the same as the one obtained using structured illumination holography [32, 33]. Moreover, the 3D resolution in fully SI trans-illumination scheme is the same as the resolution in conventional fluorescence imaging.

In trans-illumination, which is the scheme used in this paper, the gain compared to plane-wave illumination is thus much more important when considering SI illumination rather than a polychromatic incoherent illumination. This is why we only will consider quasi-monochromatic SI illumination below.

### 3.3. Modulation transfer function (MTF) and deconvolution

The major problem that emerges when using incoherent illumination, is an image contrast loss at the object highest spatial frequencies that prevents most of the image quantitative interpretations. As an example, the zero frequency (0,0,0) is accessible with any illumination angle within the collection numerical aperture. On the opposite, each frequency with the maximum lateral  $K_{or}$  is only accessible with a single maximum angle collected by the objective. More generally, the number of possible angles depends on the spatial frequency, implying there is no bijection between the spatial frequencies and the illumination angles. The lower the object spatial frequency is, the higher the number of illumination angles that are able to diffract on it. Thus, the amount of energy is higher for the lower spatial frequencies explaining the loss of contrast at high spatial frequencies.

This loss of contrast is characterized by the so-called Modulation Transfer Function (MTF) [18]. We will consider that our optical system is perfect (no optical aberration) so its MTF is the one of perfect optics with flat circular aperture stop. The sensor can also modify the MTF and needs to be taken into account in the general case [34]. For two dimensional objects

and intensity measurements (ex. daily life scene observed with a camera), the MTF is well defined [18]. However for high ( $NA_{coll}, NA_{ill}$ ) optical systems, non-intensity sensitive sensor (ex. quantitative phase imaging, QPI) and/or when 3D imaging of semi-transparent sample is considered, the MTF is more complex to describe. Streibl described a theoretical 3D MTF in intensity and phase but using the first Born and paraxial approximations [19]. More recently [35], Cotte *et al.* proposed a way to measure coherent transfer function for QPI using nano-holes and an holographic microscope in order to take into account the optical aberrations, but this approach is limited to coherent illumination. In this paper, we propose a way to determine MTF for either intensity or phase using image simulation tools [22], taking into account the response of our QWLSI sensor.

Regularization and deconvolution

As mentioned, contrast loss compensation is important for quantitative imaging. Under the hypothesis of perfect optical system, the MTF is constant over the whole field of view. A way to deconvolve the images knowing the MTF is to work in the Fourier space. In this case:

$$\tilde{I}_{Deconv} = \frac{\tilde{I}}{MTF}, \quad (10)$$

where  $\tilde{I}$  and  $\tilde{I}_{Deconv}$  are the Fourier transform of respectively the image and the deconvolved image. As the MTF usually contains zeros (*i.e.* frequencies non-transmitted by the optical system) a brutal deconvolution multiplying the image in the Fourier space by  $1/MTF$  leads to large noise amplification. Regularization methods can be used to limit this effect: the general idea is to substitute the function  $1/MTF$  by  $1/MTF_{reg}$  which presents the following properties:

$$\begin{cases} \frac{1}{MTF_{reg}} \rightarrow 1 \text{ when } MTF \rightarrow 0 \\ \frac{1}{MTF_{reg}} \rightarrow \frac{1}{MTF} \text{ else} \end{cases}. \quad (11)$$

The key point is to determine when the MTF is considered to tend to 0. We can cite for example the Tikhonov regularization [36] where an empirical constant fixes the MTF limit, or the Wiener regularization [37] which is more efficient as it also takes into account the signal-to-noise ratio (SNR) at each frequency  $\nu$ :

$$\frac{1}{MTF_{reg}^{Wiener}}(\nu) = \frac{1}{MTF(\nu)} \cdot \left[ \frac{|MTF(\nu)|^2}{|MTF(\nu)|^2 + \frac{1}{SNR(\nu)}} \right]. \quad (12)$$

In this paper, we will apply Wiener regularization in each deconvolution process. Let us now discuss a way to determine the MTF.

#### 4. Modulation transfer function determination by simulation tools

As explained in the section 3.3, the main drawback of using incoherent illumination is the contrast loss which occurs both for the intensity and the OPD. This contrast loss originates jointly from the imaging device (microscope) and the detection device (QWLSI). In order to interpret the measurements, we need to compensate for the contrast loss of OPD and intensity.

We propose now a way to determine the MTF using simulation tools applied to a set of intensity and OPD images obtained with a well-chosen radial target under arbitrary illumination spatial coherence.

#### 4.1. Generalized product of convolution for simulation of SI images

The generalized product of convolution (G-POC) is used to simulate the image formation (OPD and intensity) of any sample illuminated by a tilted collimated plane-wave, under the simple diffraction approximation [22]. This algorithm is intrinsically able to deal with thick samples as it takes into account the defocus component for each object slice: this is especially useful for 3D MTF determination.

As a SII can be considered as the incoherent superposition of coherent plane-waves, it is possible to simulate the image formation under SII by the sum of coherent EM fields obtained in the image plane. We thus use the G-POC by varying the illumination angle in order to generate a whole set of such unit EM fields. Each EM field is used to create an interferogram according to Eq. (2). The interferograms are next summed and analyzed with the QWLSI standard algorithm to obtain the SII OPD and intensity fields.

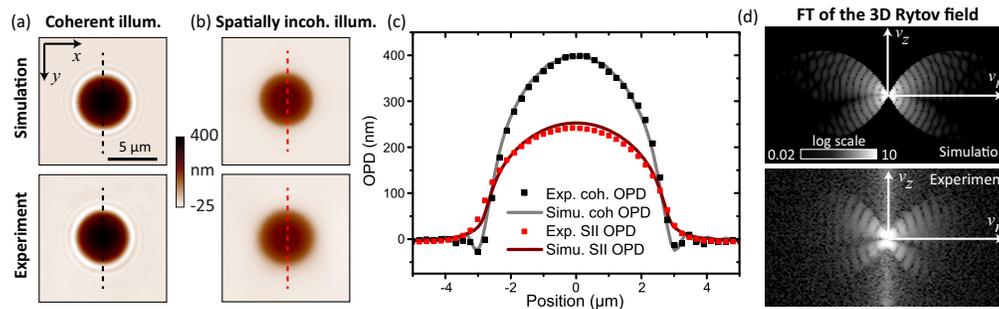


Fig. 5. (a) OPD images under coherent illumination of a  $5 \mu\text{m}$  polystyrene bead immersed in  $n_{\text{med}} = 1.542$  with the setup described in the part 2.1. Top: Simulated image using G-POC. Bottom: Experimental image. (b) Same as (a) but with SI illumination. (c) Profile plots of the OPD images. Black dots: experiment with coherent illumination (a,top). Gray line: simulation (a,bottom). Red dots: experiment with SII (a,top). Burgundy line: simulation (a,bottom). (d) Fourier transform (logarithmic scale) of the 3D Rytov EM field. Top: Simulation using G-POC. Bottom: Experiment.

Figure 5 shows the accuracy of the simulation against the experiment under coherent (Fig. 5(a)) and SI illumination (Fig. 5(b)), as confirmed by the line-outs of Fig. 5(c). The simulation of intensity and OPD images under SII is possible by varying the focus and Fig. 5(d) shows a comparison in the Fourier space between simulation with G-POC and experiment of the 3D Rytov field (see part 4.3). The 4 lobes-shapes are very similar.

G-POC allows to accurately simulate the image formation under SII and is used in next sections to calculate the MTF from the OPD images obtained with well-chosen model samples.

#### 4.2. Projective modulation transfer function

Although semi-transparent microscopic samples are in general 3D structures, 2D measurements of OPD and intensity under SII can be of interest. In particular when the so-called projective approximation [15] is valid as for thin (*i.e.* thinner than the SI axial resolution) or weakly scattering samples for example. In that cases, proper determination of a two dimensional MTF in both intensity and OPD leads to reach quantitative measurements.

To simulate the contrast loss due to incoherent field detection with a QWLSI, let us consider the following 2D parametric object defined by its complex refractive index distribution:

$$\Delta n(r, \psi) = \Delta n_0 \cos(\psi \cdot N), \quad (13)$$

where  $(r, \psi)$  are the polar coordinates,  $\Delta n_0$  a complex refractive index value,  $N$  is an arbitrary integer. This kind of object is known as a radial target and is commonly used for 2D intensity MTF measurements of imaging systems. Indeed, it contains all lateral frequencies  $v_r$  (at one  $r$  corresponds one  $v_r$ ). It can be used as a phase object (for  $\text{MTF}_{\text{OPD}}$  determination) by using a pure real  $\Delta n_0$ , or as an intensity object (for  $\text{MTF}_{\text{Intensity}}$  determination) with a pure imaginary  $\Delta n_0$ . For  $\text{MTF}_{\text{OPD}}$ , the projective theoretical OPD modulation amplitude of such an object is  $\text{OPD}_{\text{proj}} = \text{Re}[\Delta n_0] \cdot t$  where  $t$  is the object thickness which is fixed to a value as long as the projective hypothesis is valid. In the practical case, this value is chosen to be smaller than the axial resolution.

Figure 6(d) shows a simulated SII OPD image of a given radial target ( $N = 60$ ,  $\Delta n_0 = 0.02$ , Fig. 6(a)) with  $\text{NA}_{\text{coll}} = \text{NA}_{\text{ill}} = 1.3$ . This image has been obtained using a numerical combination of imaged coherent EM fields under different illumination angles, as described in the previous section. Compared to the OPD image obtained with a plane-wave illumination along the optical axis (Fig. 6(b)), both the resolution improvement and the contrast loss are visible in the center of the images. As a comparison, Fig. 6(c) shows the image obtained with a plane-wave illumination at the maximum illumination angle along the  $x$  axis: although higher frequencies are visible, the image looks clearly different from the object avoiding any direct interpretation.

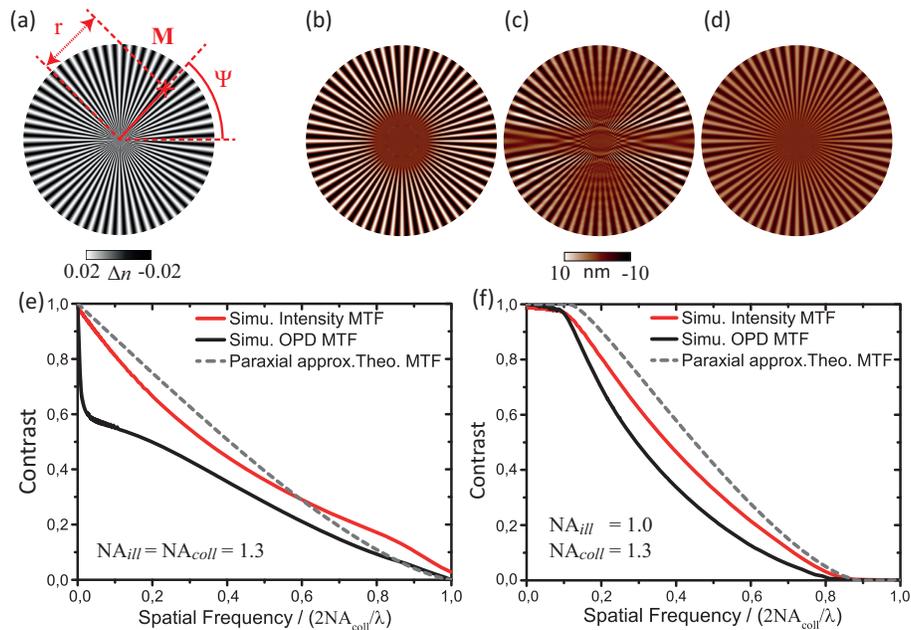


Fig. 6. (a) 2D radial target ( $N = 60$  and  $\Delta n_0 = 0.02$ ). (b) Simulated coherent OPD simulated from the object (a) with a plane-wave illumination along the optical axis. (c) Same as (b) with the maximum illumination angle  $\theta_{x,\text{ill}} = \text{asin}(\text{NA}_{\text{ill}}/n_{\text{im}})$ . (d) Simulated SII OPD obtained from the object (a) with  $\text{NA}_{\text{coll}} = \text{NA}_{\text{ill}} = 1.3$ . (e) MTF with  $\text{NA}_{\text{coll}} = \text{NA}_{\text{ill}} = 1.3$ . In red: projective MTF for the intensity obtained from the simulation. In black: projective MTF for the OPD obtained from the simulation. In dashed gray: Theoretical MTF under paraxial approximation. (f) Same as (e) with  $\text{NA}_{\text{coll}} = 1.3$  and  $\text{NA}_{\text{ill}} = 1.0$ .

To extract the OPD MTF from the simulated SII OPD and intensity images, the sinusoidal modulation is measured at different radii and is normalized by the theoretical projective OPD. The same approach is used for the intensity, using a purely imaginary  $\Delta n_0$ . Figure 6(e) shows

the resulting MTFs for the intensity (in red) and the OPD (in black), considering that  $NA_{coll} = NA_{ill} = 1.3$ . A set of different radial targets has been used to cover the required extended range of spatial frequencies ( $N=4, 8, 60$ ). The theoretical MTF under paraxial approximation [18] is also presented in dashed gray. The intensity MTF is close to the paraxial approximated one but the OPD MTF strongly differs with a fast decay at low frequencies. This effect is less visible for slightly different experimental conditions where  $NA_{coll} = 1.3$  and  $NA_{ill} = 1.0$ : in that case, shown on Fig. 6(f), the OPD MTF is much closer to the paraxial one, indicating a better contrast especially at low spatial frequencies. It is thus interesting to consider a quasi-fully SII rather than a fully SII to limit the contrast loss still offering a good lateral resolution. However, projective MTFs significantly vary with numerical apertures implying simulations need to be performed for each objective/condenser NA combination.

#### 4.3. 3D modulation transfer function

We have just seen how to determine the MTF when under the projective approximation. This function is valid only in the plane conjugated with the thin object. For thicker objects or if we want the reconstruct the 3D structure of an object, this approach is not valid any more. The 3D MTF and a stack of images acquired under SII have to be considered to extract quantitative information from measurements.

First of all, it is essential to define the theoretical OPD in 3D as the definition is not conventional. One way to define this reference OPD is to follow the approach used in diffraction tomography (DT) where a combination of EM fields acquired under various illumination angles is used [3, 38]. Each coherent EM field acquired in one plane under one illumination angle is added to the others in the Fourier space by placing the carried lateral frequencies on the Ewald sphere corresponding to its illumination angle. From this mathematical 3D complex field, it is possible to extract its phase component. Thus, one way to define the theoretical 3D OPD field ( $OPD_{DT}^{3D}$ ) using the diffraction tomography formalism in the Fourier space is:

$$\widetilde{OPD}_{DT}^{3D}(K_{ox}, K_{oy}, K_{oz}) \cdot \frac{2\pi}{\lambda} = \text{Re} \left( \int_{\vec{\theta}_i} \left[ \widetilde{E}_{Rytov}^i(k_{dx}, k_{dy}; z=0) \otimes \delta \left( \left\| \vec{k}_d \right\|^2 - \left\| \vec{k}_i \right\|^2 \right) \right] \cdot \frac{jk_{dz}}{\pi} d\vec{\theta}_i \right), \quad (14)$$

where  $\vec{K}_o$ ,  $\vec{k}_i$  and  $\vec{k}_d$  are respectively the object vectors, illumination wave-vectors and diffracted wave-vectors as defined in the part 3.2.  $\text{Re}()$  represents the real part operator,  $E_{Rytov}^i = \ln(A_i e^{j \cdot 2\pi \cdot OPD_i / \lambda})$  is the so-called Rytov EM field,  $A_i$  and  $OPD_i$  are the amplitude and the OPD measured under the illumination angle  $\vec{\theta}_i$ .  $\delta$  is the Dirac distribution. This last (and its content under brackets) is an other way to describe of the Ewald sphere. The resulting 3D OPD can be physically interpreted as the OPD accumulated during the propagation through the depth-of-field.

To simulate the contrast loss under SII, we consider now the following 3D parametric object:

$$\Delta n(r, \psi, z) = \Delta n_0 \cos(\psi \cdot N) e^{j2\pi v_{z0} z}, \quad (15)$$

where  $(r, \psi, z)$  are the cylindrical coordinates,  $\Delta n_0$  a complex refractive index value,  $N$  an integer and  $v_{z0}$  the axial period of the object. This thick object is a 3D generalization of the radial target described in Eq. (13). As before, it contains all lateral frequencies  $v_r$  (at one  $r$  corresponds one  $v_r$ ) but only one axial frequency  $v_{z0}$ .

To obtain the requested 3D MTF, we first simulate the SII OPD image for a given axial frequency  $v_{z0}$  (ex. in Fig. 7(a-left) for a SII OPD). Then a 3D MTF section ( $v_r, v_z = v_{z0}$ ) is deduced by dividing the SII OPD modulation value by its theoretical one obtained after inverse

Fourier transform of Eq. (14). The procedure is repeated for different  $v_{z0}$  to finally retrieve the complete 3D MTF (Fig. 7(b) in logarithmic scale). The same approach as presented in the previous section 4.2 is used to estimate its modulation amplitude.

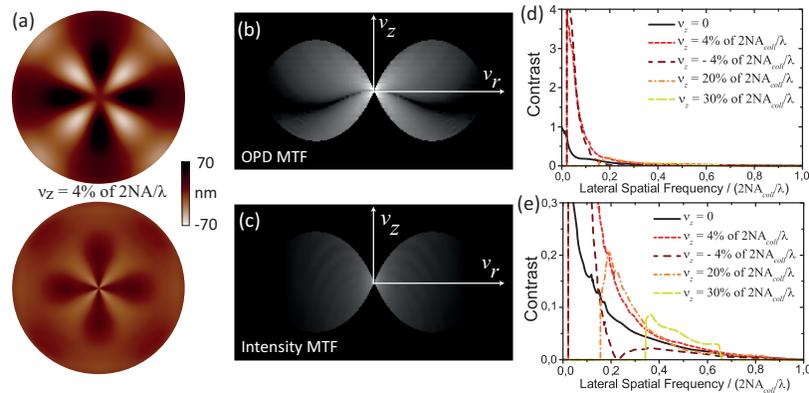


Fig. 7. (a) Imaged of a 3D radial target ( $N = 4$ ,  $v_z = 4\%$  of  $2NA/\lambda$ ) observed in the  $z = 0$  plane. Top: simulated SII OPD. Bottom: simulated Rytov combined coherent EM fields. The contrast enhancement compared to the Rytov fields is visible on the SII OPD. (b) 3D OPD MTF visualized in the  $(v_r, v_z)$  plane (logarithmic scale) considering  $NA_{coll} = NA_{ill} = 1.3$ . (c) Same as (b) for the 3D intensity MTF. (d) Profile plots from (c), modulation amplitude as a function of the lateral frequency normalized at  $2NA_{coll}/\lambda$ . Black:  $v_z = 0$ . Short dashed red:  $v_z = 4\%$  of  $2NA_{coll}/\lambda$ . Medium dashed brown:  $v_z = -4\%$ . Dashed dot orange:  $v_z = 20\%$ . Large dashed yellow:  $v_z = 30\%$ . (e) Zoom on (d).

The OPD MTF which takes into account the effect of the QWLSI grating is different from the theoretical 3D MTF as described by Streibl [19]. For example, some frequencies close to the edge of the peanut shaped have a modulation which is upper than 1. These frequencies are responsible for the conical-shape of defocused SII OPD (see Fig. 8(b)) and are created by the barely visible shift of each unit interferogram formed by an unit illumination angle. There are also frequencies with negative  $v_z$  where the MTF vanishes inside the peanut-shaped structure (Figs. 7(d) and 7(e), brown medium-dashed curve).

The 3D MTF missing frequencies are observed experimentally on microbeads, with a nice butterfly-shape in Fig. 5(d): four lobes are clearly visible.

## 5. Experimental validation on calibrated samples

In the previous sections, we determined the value of the contrast loss on intensity and OPD images due the illumination incoherence. We experimentally compared the 3D spatial frequencies of images acquired with a QWLSI of model objects (microbeads) with those deduced from our simulation model (Fig. 5). The agreement is very good.

We now propose to use the calculated MTF to correct images of phase objects considering either projective hypothesis or 3D stacks. Two cases are studied:  $5 \mu\text{m}$  beads (for quantitative value discussion) and  $100 \text{ nm}$  beads (i.e. below the diffraction limit for resolution purpose).

### 5.1. Quantitative measurement comparison

Let us first consider the study of polystyrene micro-beads. We use  $5 \mu\text{m}$  beads (Sigma-Aldrich, St-Louis, USA) of theoretical refractive index  $n=1.6$ ; the beads are deposited on a conventional cover slip, then immersed in an aqueous immersion medium (Cargille, Cedar Grove, USA) of

refractive index  $n_{med} = 1.542$  measured with a commercial Abbe refractometer (2WAJ, HuiXia Supply, China), and finally sandwiched using another cover glass.

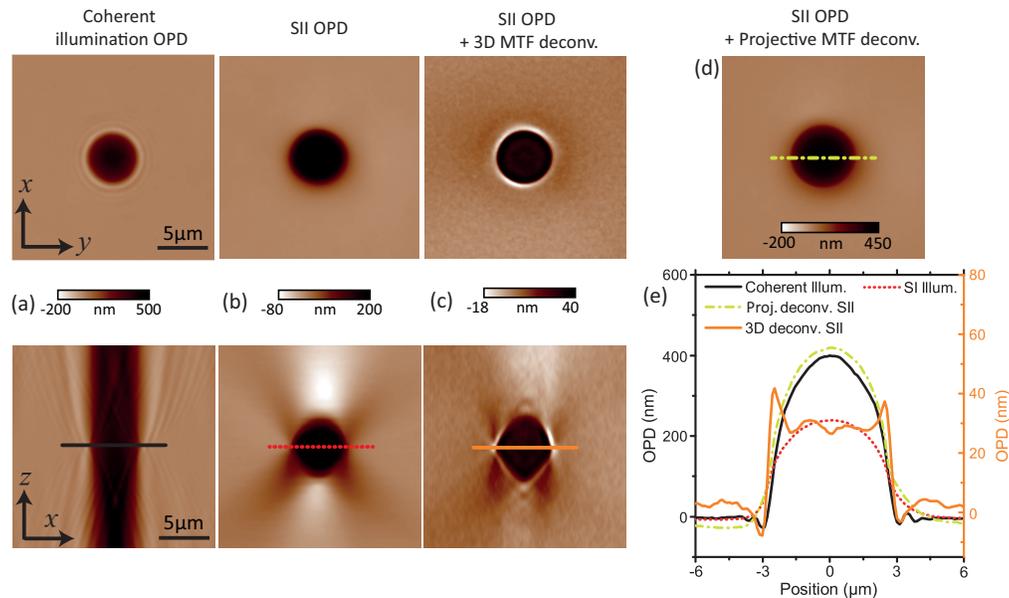


Fig. 8. OPD Z-stacks of a  $5 \mu\text{m}$  polystyrene bead. Up:  $z = 0$  plane. Down:  $y = 0$  plane. (a) OPD measured with a quasi-plane-wave illumination. The Z-stack is obtained by numerical propagation. (b) OPD stack measured under SII with axial scanning of the objective. (c) Same as (b) plus deconvolution using the 3D  $\text{MTF}_{OPD}$ . (d) Same as (b) plus deconvolution of the  $z = 0$  image (b).up using the projective  $\text{MTF}_{OPD}$ . (e) OPD line-outs along  $x$  by the center of the bead. Black curve: coherent illumination. Red dot curve: SI illumination. Yellow dashed dot curve: SII plus projective  $\text{MTF}_{OPD}$ . Orange curve: SII plus 3D  $\text{MTF}_{OPD}$ .

First, one bead is imaged under SII in different  $z$  planes by moving the objective with an axial step of  $300 \text{ nm}$ . We obtain a raw Z-stack of SII OPD using the QWLSI (Fig. 8(b)). Then, for comparison purpose, the EM field under coherent illumination is measured in the bead median plane. The spatial coherence is obtained by closing the Köhler aperture diaphragm to its minimum. An approximate refractive index value of  $n_{coh} = 1.607 \pm 0.05$  can be extracted from the coherent OPD, considering that  $OPD = t \times (n_{coh} - n_{med})$ , where  $t$  is the local bead thickness deduced from its diameter in the OPD image [15]. The coherent EM field can be numerically propagated [1] to obtain a Z-stack (Fig. 8(a)).

As expected, the bead is much more resolved in the  $z$  axis on the raw SII OPD map (lower Fig. 8(b)) than in the coherent OPD stack (lower Fig. 8(a)). Also as expected, due to the frequency loss under incoherent illumination, a value decay is observed between the coherent measurement and the incoherent one : the maximum falls from  $400 \text{ nm}$  in the coherent OPD image (upper Fig. 8(a)) down to  $240 \text{ nm}$  in the raw SII OPD image (upper Fig. 8(b)). The lobes of the 3D  $\text{MTF}_{OPD}$  (Fig. 7(b)) explain the V-shape of the SII OPD along  $z$  and the asymmetry observed between positive and negative  $v_z$  of the 3D  $\text{MTF}_{OPD}$  explains why the map is non symmetrical about the  $z = 0$  plane.

By a 2D deconvolution using the projective  $\text{MTF}_{OPD}$  (Fig. 6) one is able to compensate this contrast loss and retrieve OPD values now close to the coherent ones (Figs. 8(d) and 8(e)). It means that in focus SI 2D-deconvolved images can be interpreted in the same way as coherent OPD images (*i.e.* projective approximation).

By calculating first the Rytov 3D EM field and then deconvolving this 3D field using the 3D  $MTF_{OPD}$  (Fig. 7(b)), the artifacts on the defocused images (visible as a V-shape and white spots on the Fig. 8(b-down)) are strongly reduced (Fig. 8(c-down)). The ring visible around the bead after 3D deconvolution (Fig. 8(c-up)) is due to the non-collected frequencies (Fig. 4(b)). The remaining defocused artifacts may be explained, in particular their non-symmetric aspect, by the Gouy phase anomaly [39] that still exists with incoherent illumination.

The parabolic shape typical of the bead OPD visible on Fig. 8(e) for non-3D-deconvolved OPD images becomes more flat for 3D deconvolved images (Fig. 8(c-up)). The OPD values are also reduced compared to the coherent OPD (from 400 nm to 26 nm). It can be explained because this 3D deconvolved OPD corresponds to the OPD accumulated in each slice of the image. Indeed, when the 3D deconvolved OPD is summed along the optical axis, the resulting image is close to the 2D deconvolved image with a maximum OPD value of 450 nm in the center of the bead and a parabolic shape.

## 5.2. Resolution increase with SII

It is obvious when looking to the results on  $5\ \mu\text{m}$  beads (Fig. 8(down)) that SII leads to a much higher axial sectioning compared to coherent illumination. For lateral resolution comparison we consider the study of  $100\ \text{nm}$   $\text{TiO}_2$  beads immersed in water. These beads are non-resolved objects even under SII ( $r_{x,y}^{SII} = 269\ \text{nm}$  at  $\lambda = 700\ \text{nm}$ ) and can thus be considered as a point source.

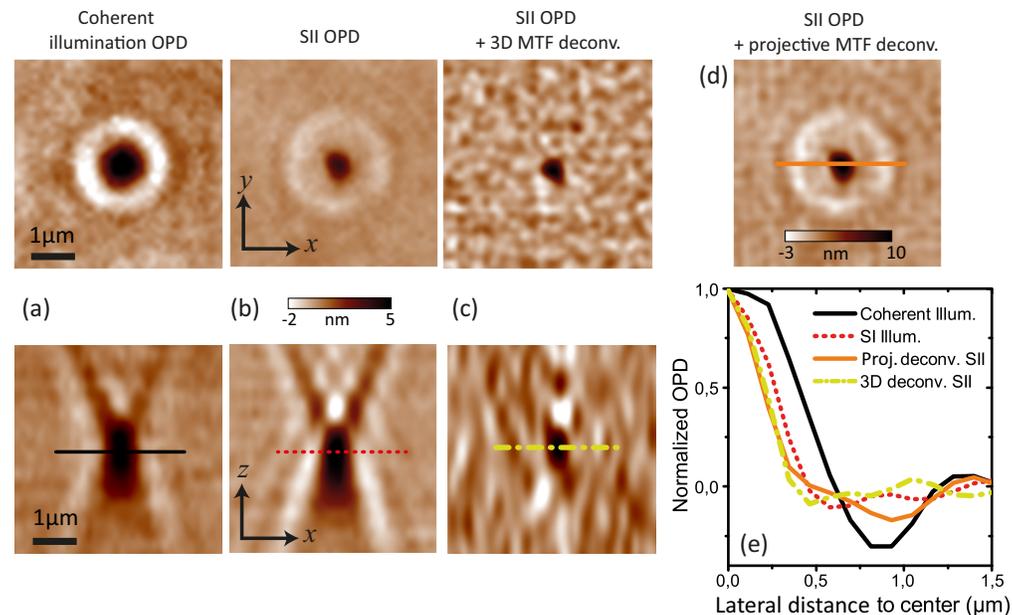


Fig. 9. OPD Z-stacks of a  $100\ \text{nm}$   $\text{TiO}_2$  bead. Up:  $z = 0$  plane. Down:  $y = 0$  plane. (a) OPD measured with a quasi-plane-wave illumination. The Z-stack is obtained with axial scanning of the objective. (b) OPD stack measured under SII with axial scanning of the objective. (c) Same as (b) plus deconvolution using the 3D  $MTF_{OPD}$ . (d) Same as (b) plus deconvolution of the  $z = 0$  image (b).up using the projective  $MTF_{OPD}$ . (e) OPD profile plots in the  $z = 0$  plane of coherent OPD (black line), SII OPD (red dot line), 2D deconvolved SII OPD (orange line) and 3D deconvolved SII OPD (yellow dashed dot line). The resolution gain using SII is clearly visible.

Before deconvolution procedure, coherent (Fig. 9(a-bottom)) and incoherent illumination (Fig. 9(b-bottom)) axial OPD distributions are similar in first approach. The maximum axial frequency collected from this non-resolved structure is indeed the same for coherent and incoherent illumination (Fig. 4(b)). However, when using 3D deconvolution, the axial resolution is again improved with SII (Fig. 9(c-down)) compared to coherent illumination (Fig. 9(a-down)): the full-width at half-maximum of the OPD is equal to  $1 \mu\text{m}$  for deconvolved SII stack compared to  $2.4 \mu\text{m}$  for the coherent one.

For the lateral resolution (Fig. 9(e)), the point spread function is measured by radial averaging of the OPD images in the  $z = 0$  plane. The theoretical PSF radius  $r_{PSF}$  is calculated using the equation:

$$r_{PSF} = 1.22 \frac{\lambda}{NA_{coll} + NA_{ill}}, \quad (16)$$

with  $\lambda = 700 \text{ nm}$ ,  $NA_{coll} = 1.3$  and  $NA_{ill} = 0$  for coherent illumination or  $NA_{ill} = 1.3$  for totally SII. The results are summed up in the Table 5.2.

Table 1. Comparison between theoretical and experimental PSFs.

	Theo. PSF radius (nm)	Exp. measurements (nm)
Spatially coherent illum.	657	$620 \pm 30$
SII	328	$450 \pm 30$
SII + 2D deconv.	328	$400 \pm 30$
SII + 3D deconv.	328	$370 \pm 30$

As predicted, the lateral resolution is approximately increased by a factor 2 for 3D deconvolved SII OPD compared to spatially coherent illumination, the usual way to make QPI. The resolution is a little bit larger with SII than the theoretical one: this can be explained either by the optical aberration, or by the noise at very high spatial frequency which kills the useful information about the sample and thus cannot be retrieved by deconvolution. Moreover, a single 2D OPD measurement deconvolved with the theoretical projective MTF is not enough to completely remove the diffraction rings (Fig. 9(d)). A 3D MTF deconvolution on a stack of OPD images is required to get rid of the diffraction rings.

## 6. Conclusion

We demonstrated that single-shot quantitative phase imaging is possible even with incoherent illumination. This approach allows both lateral and axial resolution increase compared to the classical QPI under coherent illumination. Spatially incoherent illumination leads to much more resolution gain compared to polychromatic incoherent illumination. The lateral resolution with fully-SI trans-illumination scheme is the same as the one obtained using structured illumination holography [32, 33]. Thus, the 3D resolution is the same as for conventional fluorescence imaging.

However, SII also leads to spatial frequency dumping, characterized by the MTF. This dumping leads to non quantitative images and needs to be compensated. We propose a way to simulate the OPD MTF for any kind of illumination scheme. The particular case of projective MTF and 3D MTF are studied using our simulation tools. Moreover, the effect of the sensor (QWLSI) has also been taken into account to reconstruct the images.

As shown on polystyrene beads, a deconvolution of 2D SII OPD images using projective MTF leads to quantitative images that can be interpreted as if they were spatially coherent OPD images but with a doubled lateral resolution and a strong rejection of out-of-focus structures.

This approach will be useful for highly resolved dry-mass measurements [40] or anisotropy imaging [41]. For 3D SII OPD stacks, we consider Rytov EM field as a quantitative way to describe OPD variation in space. In this case, the OPD can be interpreted as if each slice was carrying the OPD accumulated through the depth-of-field. Moreover with 3D deconvolution, defocused OPD artifacts are reduced. This approach will be considered to obtain refractive index tomography and sample 3D structure imaging.

The resolution under SII is much better than under classical coherent illumination, with a gain close to 2 for lateral resolution. The axial resolution improvement using SII is particularly interesting when the sample is much larger than the depth-of-field, as the axial sectioning is very poor under coherent illumination.

With our deconvolved SII QPM technique, we will now consider thick biological sample imaging with the same 3D resolution as deconvolved fluorescence images. SII would be particularly useful when dealing with strongly scattering samples as the spatial coherence required for classical QPM may be lost through the sample. Experimental MTF determination will be studied to take into account the optical aberrations. We will also consider to achieve diffraction tomography in order to measure the local sample refractive index. This approach, using SII illumination and sample scanning, will speed-up and simplify the state-of-the-art way to do diffraction tomography (*i.e.* illumination angle scanning).

### **Acknowledgments**

Financial support from the QuITO project funded by FUI and PACA Region is gratefully acknowledged. This work was also partially supported by ANR grant France Bio Imaging (ANR-10-INSB-04-01) and France Life Imaging (ANR-11-INSB-0006) Infrastructure networks.

---

## Table des figures

---

1.1	Schéma représentatif des processus de relaxation qui entrent en compétition après le passage d'une molécule dans un état excité. L'axe vertical est un axe en énergie, tandis que les états sont groupés horizontalement selon leur multiplicité de spin. Les transitions radiatives sont symbolisées par des flèches droites et les transitions non-radiatives par des flèches ondulées. L'état vibrationnel fondamental de chaque état électronique est représenté par une ligne épaisse et les autres états vibrationnels par un ligne fine. L'absorption d'un photon incident peut porter une molécule dans l'un des états vibrationnel de $S_1$ , $S_2$ ...	7
1.2	Schéma de principe de la spectroscopie de corrélation de fluorescence.	9
1.3	Schéma de principe d'un montage d'holographie numérique en configuration (a) hors d'axe et (b) sur l'axe.	13
1.4	Schéma de principe du montage de microscopie de phase quantitative grâce à l'utilisation d'une illumination speckle dynamique [17]. On décrit les différents éléments du montage : D, diffuseur monté sur un moteur électrique afin de pouvoir le faire bouger ; BS1 et BS2, cubes séparateurs ; L1, L2 et TL lentilles de focales respectives 250, 250, and 200 mm ; C, condenseur ; OL, lentille de l'objectif utilisé ; G, réseau de diffraction ; A, diaphragme qui permet de sélectionner l'ordre de diffraction zéro. Le faisceau est basculé grâce au cube BS2.	14
1.5	Schéma de principe d'un montage de microscopie de phase par diffraction sur un réseau [24]. F1 et F2 : filtres ; M1, M2 : miroirs ; L1-4 lentilles de focales respectives f1-4 ; G : réseau ; SF : filtre spatial ; IP1, 2 : plans images ; SF : filtre spatial.	16

## TABLE DES FIGURES

---

1.6	Schéma de principe d'un montage de microscopie de phase de Fourier [27]. VPS : point source virtuel; CL : lentille de correction; IP : plan image; P : polariseur; BM : lame séparatrice; FL : lentille de Fourier; PPM : modulateur de phase programmable; CCD : caméra. . . . .	17
1.7	Schéma de principe d'un montage de la technique de microscopie à spirale de phase [29]. L'échantillon est illuminé par un faisceau collimaté. La lumière traverse ensuite l'objectif (NA 0.95, 63x). M1, M2 et M3 : miroirs; L1, L2, L3 et L4 : lentilles. La transformée de Fourier est projetée sur la partie supérieure du SLM. . . . .	18
1.8	Illustration de l'augmentation de contraste créée par la technique sur une cellule COS-7. Le contraste permet la visualisation et l'identification des constituants intracellulaires. (a) Image d'intensité de la cellule imagée, (b) Image d'OPD de la cellule, (c) image d'OPD avec application d'un filtre passe haut pour réhausser les détails, (d) schéma représentant les constituants identifiés sur l'image (a) et (e) représentation schématique de la cellule et de ses différents constituants identifiés sur les images (b) et (c). . . .	20
1.9	Schéma de principe d'un analyseur de front d'onde à décalage quadri-latéral. Le front d'onde incident est diffracté par le MHM. Les 4 répliques créées (2 suivant $\vec{x}$ et 2 autres dans la direction $\vec{y}$ orthogonale) vont interférer sur le capteur CCD quelques millimètres plus loin. Le décalage entre les différentes répliques a volontairement été exagéré afin d'en illustrer le principe. . . . .	20
1.10	(a) Fonction transmittance avec approximation à 3 niveaux (+1; 0; -1), (b) Masque de Hartmann modifié et (c) Amplitude de Fourier de (b) suivant les fréquences $\nu_x$ et $\nu_y$ . En vert : ordres diffractés par le masque de Hartmann modifié. En bleu : courbe en sinus cardinal représentant l'amplitude de la transformée de Fourier d'une fonction porte de largeur $o$ . . . . .	21
1.11	Illustration du principe du décalage quadri-latéral pour un modèle à 1 dimension. . . . .	22
1.12	(a) Image brute d'un interférogramme obtenu en faisceau collimaté sans échantillon sur l'analyseur de front d'onde, (b) zoom sur une partie de l'interférogramme (a). . . . .	22
1.13	(a) Formation d'un interférogramme $I$ unidimensionnel en présence d'une surface d'onde incidente plane. (b) Formation d'un interférogramme $I$ unidimensionnel en présence d'une surface d'onde incidente non plane. (c) Transformée de Fourier de $I$ obtenue en (a). (d) Transformée de Fourier de $I$ obtenue en (b). . . . .	25
1.14	Illustration du post-traitement d'un interférogramme pour remonter aux informations d'intensité et d'OPD. Les démodulations s'effectuent par des fenêtrages symbolisés par des carrés colorés autour de certains pics de l'interférogramme. Les symboles TF et TF <sup>-1</sup> signifient respectivement transformée de Fourier et transformée de Fourier inverse. . . . .	27
1.15	Illustration du phénomène de repliement de spectre dans le cas d'un échantillonnage insuffisant pour conserver l'intégrité du signal. . . . .	28

1.16	Schéma illustrant les notations permettant de décrire l'espace de Fourier d'un interférogramme obtenu par interférométrie à décalage. Le rectangle gris représente la bande passante nécessaire pour le fenêtrage de l'information utile de la phase modulée, le rond vert correspond à l'information utile, le rond jaune correspond à l'information utile pour le pic central correspondant à l'intensité. Le point $M_{\min}$ est le coin inférieur gauche de la fenêtre de bande passante et $\theta$ est l'orientation du réseau. . . . .	29
1.17	Représentation graphique du grandissement nécessaire pour échantillonner correctement le signal dans le cas d'un détecteur tel que $T_{pix}=29,6 \mu\text{m}$ et $\lambda = 0,55 \mu\text{m}$ , dans le cas d'un contenu fréquentiel de l'intensité négligé (courbe orange) ou non (courbe verte). Les objectifs utilisés dans les travaux suivants sont représentés par des croix bleues au sein du graphique. . . . .	30
1.18	(a) Schéma en coupe de l'appareil suivant l'axe optique. (b) Schéma représentant le montage optique. . . . .	33
2.1	Illustration du principe de la mesure en projectif. Le front d'onde se déforme de plus en plus à mesure que la lumière se propage au sein de l'échantillon. La différence de chemin optique mesurée est le résultat de l'accumulation d'un retard de phase sur toute l'épaisseur de l'objet imagé en raison de sa différence d'indice avec le milieu extérieur. . . . .	36
2.2	Schéma illustrant les termes fidélité, justesse et exactitude issus du vocabulaire de la métrologie. Dans le premier cas, les mesures sont proches les unes des autres (bonne fidélité) mais en dehors de la zone de probabilité de la valeur vraie (mauvaise justesse). Dans le deuxième cas, les mesures sont dans la zone où se trouve la valeur vraie et le "barycentre" des points est au centre de la zone rouge (bonne justesse) mais les mesures sont dispersés entre elles (mauvaise fidélité). Enfin, le dernier cas présente des mesures justes et fidèles.	39
2.3	(a) Ecart type spatial des valeurs d'OPD en fonction du moyennage des acquisitions réalisé, (b) Histogramme des valeurs d'OPD en fonction du moyennage des acquisitions réalisé et (c) évolution de l'écart type des pixels en fonction du nombre d'acquisitions moyennées en échelle log-log. Observation avec un objectif à air de grandissement $40\times$ et d'ouverture numérique $ON=0,75$ d'une zone vide de l'échantillon de $300\times 400$ pixels. . . . .	40
2.4	Mesure par AFM d'un échantillon de silice fondue gravé d'un motif périodique, de période $10,88\mu\text{m}$ de profondeur de gravure $185 \pm 7 \text{ nm}$ . . . . .	41
2.5	(a) Image d'OPD de l'échantillon de silice fondue gravé d'un motif périodique de période $10,88\mu\text{m}$ de profondeur de gravure $185 \pm 7 \text{ nm}$ . (b) Histogramme de l'image d'OPD présentée en (a). Observation avec un grandissement total de $80\times$ , $ON=1,3$ . Échelle = $10 \mu\text{m}$ . . . . .	43
2.6	(a) Image d'OPD simulée par <i>POC</i> , (b) Structure de l'échantillon ( $n_{\text{mire}} = 1,455$ et $n_{\text{air}} = 1$ à $\lambda=700 \text{ nm}$ ). Éclairage cohérent, grandissement $100\times$ et ouverture numérique $n= 1,3$ . . . . .	44

## TABLE DES FIGURES

---

2.7	(a) Représentation schématique de la fibre optique monomode imagée, (b) 3 images de phase quantitative des différents éléments de la fibre optique, (c) image d'OPD de la fibre. (d) Comparaison entre l'OPD mesurée et l'OPD simulée sous l'hypothèse du régime projectif. Observation au 100x (images (b)) et au 40x (image (c)), ON=0,6, source blanche filtrée grâce à un filtre passe bande $700 \pm 30$ nm. Barre d'échelle = $10 \mu\text{m}$ . . . . .	47
2.8	(a) Schématisation de la sphère contenant solvant + soluté, (b) Illustration de l'OPD mesuré. . . . .	51
2.9	Schéma du montage expérimental pour la mesure de masse sèche dans le cadre du régime projectif. . . . .	53
2.10	(a) Évaluation de la fluctuation de la mesure de masse sèche de 2 cellules HeLa fixées. L'imagerie a été effectuée avec un objectif à air de grandissement $40\times$ et d'ouverture numérique ON=0,75. Le grandissement total du système d'imagerie est de $80\times$ afin d'échantillonner correctement le signal sur le détecteur. (b) & (c) Images d'OPD brute du champ où les deux cellules sont imagées. (d) & (e) Résultat de la segmentation des images (b) & (c). . . .	56
2.11	(a) Evolution du volume optique avec la mise au point pour une cellule COS-7 en mitose de $40 \mu\text{m}$ diamètre (carrés rouges) et (b) une levure de type <i>S.cerevisiae</i> de $5 \mu\text{m}$ de diamètre (carrés verts). (c) Résultats précédents tracés relativement au plan de mise au point. Les barres d'erreur ont été calculées en évaluant l'écart type d'une zone vide de $50$ par $50$ pixels sur chaque image de la pile. . . . .	58
2.12	Evolution de l'OPD avec la cohérence spatiale. Mesures réalisées sur un échantillon de cellules fixées avec un objectif à air (grandissement $40\times$ , ON=0,75) et un condenseur classique. . . . .	59
2.13	(a) Image brute d'OPD et (b) image d'OPD avec application d'un filtrage passe haut de 30% des fréquences maximales de l'image d'un globule rouge. (c) Profil tracé sur l'image (a) suivant la ligne en pointillés. (d) Histogramme de la valeur d'écart type d'OPD mesuré sur le rectangle sur l'image (a). . .	61
2.14	(a) Exemple d'image brute d'OPD d'un globule rouge, (b) image d'OPD filtrée à l'aide d'un filtrage passe haut, (c) représentation graphique du volume optique/masse sèche en fonction de la surface pour la population de globules rouges étudiée (carrés bleus). Représentation sous forme d'histogramme en fonction du volume optique/masse sèche de la répartition de la population de globules rouges (d) sans et avec (e) application du filtre passe haut sur les images. L'imagerie est réalisée avec un objectif à immersion de grandissement $100\times$ . le grandissement total est de $200 \times$ , ON=1,3. . . . .	62
2.15	Représentation schématique des différentes étapes du cycle cellulaire chez les eucaryotes et de la quantité d'ADN associée. <i>Source : <a href="http://www.svt-monde.org">http://www.svt-monde.org</a></i> . . . . .	66
2.16	Représentation schématique des différentes phases de croissance d'une population cellulaire. . . . .	68

2.17	Représentation schématique du cycle des levures <i>S.cerevisiae</i> [71] Les couleurs font références aux différentes étapes du cycle identifiables grâce à des paramètres morphologiques. La couleur verte correspond à la phase G1 du cycle, la couleur orange à la phase S et la couleur rose aux phases G2 et M.	69
2.18	Images d'OPD à un temps $t$ d'une population de levures <i>S.cerevisiae</i> en conditions de croissance exponentielle (en haut) et état stationnaire (en bas). (a) & (c) Images brutes, (b) & (d) images filtrées avec un filtrage passe haut. Les 3 types de levures sont mises en évidence grâce à des rectangles en pointillé. Observation avec un objectif 40×, ON=0,75 + grandissement supplémentaire 2×. Échelle : 10µm.	71
2.19	Observation de la différence de volume optique/matière sèche en fonction de la surface de chaque levure d'une population diploïde de <i>S.cerevisiae</i> en pré-bourgeonnement ( <i>en carrés verts</i> ), en phase de bourgeonnement précoce ( <i>en carrés oranges</i> ) et pleinement bourgeonnantes ( <i>en carrés roses</i> ) (a) en conditions de culture exponentielles et (b) en phase stationnaire. Représentation en diagramme de boîtes à moustaches des populations de <i>S. cerevisiae</i> (c) en croissance exponentielle et (d) en phase stationnaire. Les boîtes représentent la médiane (trait central), le premier quartile (bas de la boîte), le dernier quartile (haut de la boîte), la moyenne (carré central), le 5 <sup>ème</sup> centile (patte du bas) et le 95 <sup>ème</sup> centile (patte du haut) des statistiques sur les différentes expériences. Observation avec un objectif 60×, ON=0,75. Source blanche filtrée $700 \pm 30$ nm. $3 \cdot 10^6$ cellules/ml.	72
2.20	Histogramme avec occurrences normalisées des mesures de <i>S. Cerevisiae</i> (a) en croissance exponentielle et (b) en état stationnaire. Répartition (c) des 434 levures diploïdes en croissance exponentielle et (d) des 303 levures diploïdes en phase stationnaire en fonction de leur phase au sein du cycle. Observation avec un objectif 60×, ON=0,75. Source blanche filtrée $700 \pm 30$ nm. $3 \cdot 10^6$ cellules/ml.	73
2.21	Comparaison de la masse occupée par le bourgeon de levures diploïdes dans des conditions de croissance différentes avec occurrences normalisées.	75
2.22	OPD de levures <i>S.pombe</i> (a) haploïdes de type h+, (b) haploïdes de type h-, (c) diploïdes. OPD filtrée à l'aide d'un filtrage passe haut dans l'espace de Fourier pour mettre en évidence les détails des levures imagées (d) haploïdes de type h+ et (e) diploïdes. L'échelle représente 20µm sur l'image. Observation et imagerie avec un objectif à air de grandissement 60×, ON=0,75.	77
2.23	Représentation schématique du cycle cellulaire de levures de type <i>S.pombe</i> avec mise en évidence des différentes étapes. Source : <a href="http://www.pha.jhu.edu">http://www.pha.jhu.edu</a>	78

## TABLE DES FIGURES

---

2.24	(a) Répartition de la différence de volume optique/matière sèche en fonction de la surface de chaque levure de 3 populations de <i>S.pombe</i> haploïdes de type h+ ( <i>en carrés verts</i> ), de type h- ( <i>en carrés violets</i> ) et diploïdes ( <i>en carrés oranges avec bande horizontale blanche</i> ) en conditions de culture exponentielles. (b) Histogramme des mesures de masse sèche de <i>S. Pombe</i> haploïdes et diploïde en conditions de croissance exponentielle avec occurrences normalisées. (c) Représentation en diagramme de boîtes à moustaches des populations de <i>S.pombe</i> haploïdes et diploïde en croissance exponentielle. Les boîtes représentent la médiane (trait centrale), le premier quartile (bas de la boîte), le dernier quartile (haut de la boîte), la moyenne (carré central), le 5 <sup>ème</sup> centile (patte du bas) et le 95 <sup>ème</sup> centile (patte du haut) des statistiques sur les différentes expériences. Observation et imagerie avec un objectif à air. Grandissement total 60×, ON=0,75. Source blanche filtrée $\lambda=700 \pm 30$ nm. . . . .	79
2.25	Résultat de la partition de la population étudiée plus haut de levures <i>S. cerevisiae</i> diploïde en croissance exponentielle (a) non supervisée et (b) supervisée. . . . .	83
2.26	Représentation graphique en 3 dimensions de la population de <i>S. cerevisiae</i> diploïde en croissance exponentielle en fonction des paramètres surface, volume optique et (a) ellipticité et (b) circularité. Représentation en 2 dimensions des paramètres ellipticité (c) et circularité (d) en fonction de la surface. . . . .	86
2.27	Résultats de la classification non supervisée des populations. On compare les classifications utilisant (b) le critère d'ellipticité et (d) le critère de circularité des populations de levures présentées et identifiées par l'utilisateur (a) et (c). Les centroïdes des populations identifiées sont représentés par des cercles oranges et bleus sur les images et les populations à classer sont séparées schématiquement à l'aide de rectangles en pointillés gris. . . . .	87
2.28	Images d'OPD du suivi temporel de levures <i>S.cerevisiae</i> diploïdes en croissance exponentielle avec segmentation. Un agrandissement de la levure segmentée est réalisé et présenté dans le coin en bas à gauche afin de rendre en compte de la segmentation. . . . .	89
2.29	Suivi temporel de levures <i>S.cerevisiae</i> diploïdes dans des conditions de croissance exponentielle (a) et dans un état stationnaire (b). Sur la figure (a), on suit la levure A (courbe rose) qui donnera 2 bourgeons : levure B (courbes verte) et levure C (courbe violette). La courbe noire représente la somme des masses des différentes levures dans le champ. La levure B donnera ensuite la levure D (courbe jaune). Sur la figure (b), on suit les levures A (courbe rose) et B (courbe verte), la levure A bourgeonne pour donner la levure C (courbe jaune). . . . .	89
2.30	Evolution de la masse sèche de levures <i>S.pombe</i> haploïdes en croissance exponentielle en fonction du temps. Observation et imagerie avec un objectif à air, grandissement total 80×, ON=0,75, $\lambda=700 \pm 30$ nm. . . . .	90

2.31	Evolution de la surface d'une levure <i>S.pombe</i> haploïde en croissance exponentielle en fonction du temps. Observation et imagerie avec un objectif à air, grandissement total $80\times$ , $ON=0,75$ , $\lambda=700 \pm 30$ nm. . . . .	91
2.32	Schéma du montage Phase/fluorescence en simultané. Le microscope utilisé est composé de deux étages. L'imagerie de phase est réalisée avec la lumière filtrée proche infra rouge à l'aide du filtre passe bande $700\pm 30$ nm. . . . .	95
2.33	(a) Différence de volume optique/matière sèche en fonction de la surface de chaque cellule imagée d'une population de 83 cellules HT1080 Lifeact fluorescentes ( <i>en carrés bleus</i> ) et d'une population composée de 274 cellules HT1080 wild type ( <i>en carrés roses</i> ) en conditions de culture exponentielles. (b) Histogramme des populations observées en (a). Observation avec un objectif $40\times$ et un grandissement supplémentaire $2\times$ , $ON=0,75$ et source blanche filtrée $\lambda=700\pm 35$ nm. . . . .	97
2.34	(a) Observation de la différence de volume optique/matière sèche en fonction de la surface de chaque cellule d'une population de cellules COS-7 contrôle ( <i>en carrés verts</i> ) et COS-7 marquées ( <i>en carrés bleus</i> ) en conditions de culture exponentielles. (b) Histogramme de la distribution de masse sèche des deux populations observées en (a). Observation avec un objectif à air avec un grandissement total de $80\times$ , $ON=0,75$ . La source blanche est filtrée $\lambda=700 \pm 35$ nm. . . . .	99
3.1	Vision schématique présentant le potentiel intérêt d'utiliser une mesure de polarisation en plus d'une mesure de phase. . . . .	104
3.2	Représentation schématique des différents vecteurs issus de la propagation d'une onde plane dans un milieu anisotrope. . . . .	106
3.3	Succession d'éléments optiques caractérisés par des matrices de Jones ( $T_i$ )	107
3.4	Illustration du principe. (a) Représentation schématique des différents axes du système et (b) de la variation de l'OPD avec l'orientation de la polarisation respectivement à une valeur initiale pour un objet biréfringent linéaire uniaxe. . . . .	112
3.5	Représentation de l'intensité normalisée du champ électromagnétique suivant les directions parallèle et perpendiculaire en fonction de $\theta$ . . . . .	119
3.6	Résultats de mesure de retard calculée pour des valeurs simulées allant de 0 à $3 \mu\text{m}$ en utilisant $N=6$ et $N=18$ angles de polarisation pour construire le set d'images d'OPD. . . . .	124
3.7	Erreur absolue réalisée sur la mesure de retard pour des valeurs simulées allant de 0 à $3 \mu\text{m}$ en utilisant $N=6$ et $N=18$ angles de polarisation pour construire le set d'images d'OPD. . . . .	125
3.8	Erreur absolue réalisée sur la mesure d'angle $\Theta_0$ pour des valeurs de retard allant de 0 à $10 \mu\text{m}$ en utilisant $N=6$ et $N=18$ angles de polarisation pour construire le set d'images d'OPD. . . . .	126
3.9	OPD Normalisé en fonction de l'angle pour différentes valeurs de retard. .	126

## TABLE DES FIGURES

---

3.10	Principe du traitement du stack d'images d'OPD polarisées (a) afin de créer numériquement deux images dont le contraste dépend du retard $\Delta\delta$ (b) et de l'orientation locale $\theta_0$ (c). . . . .	129
3.11	Schéma du montage expérimental dédié à l'imagerie de retard. . . . .	131
3.12	(a, c et e) Représentation de la distribution de la valeur d'OPD de zones vides de l'échantillon résultant de l'association d'images prises à des angles de polarisation différents (0, 60 et 90°) et d'une référence prise à un 0°. L'échelle sur la figure (b) représente 6 $\mu\text{m}$ . Observation réalisée avec un grandissement total de 80 $\times$ avec un objectif d'ouverture numérique égale à 1,3.) . . . . .	133
3.13	. Imagerie d'une fibre de verre de diamètre environ 10 $\mu\text{m}$ placée dans un milieu d'immersion aqueux d'indice déterminé grâce à un réfractomètre d'Abbe. (a) Image d'OPD, (b) image de retard $\Delta\delta$ et (c) image d'orientation de la région délimitée par le carré vert sur l'image (b). Observation avec un objectif à immersion de grandissement de 60 $\times$ avec ON=0,6. L'échelle représente 20 $\mu\text{m}$ sur l'image. . . . .	135
3.14	Représentation en droite des indices de cristaux de quartz dans 2 milieux d'immersion différents. Observation et imagerie au grandissement total 40 $\times$ , ON=0,75. . . . .	137
3.15	Images d'une fibre de collagène. (a) OPD pour un angle de polarisation quelconque, (b) image de retard $\Delta\delta$ , (c) profil de la fibre de collagène imagée tracé suivant le trait rouge sur l'image (a) et (d) & (e) image de contraste d'orientation. L'échelle tracée sur les images (a) et (b) représente 5 $\mu\text{m}$ . (ON=1,3 grandissement total de 100 $\times$ ). . . . .	139
3.16	Modèles de vésicules de dimensions différentes qui peuvent être créées artificiellement. . . . .	140
3.17	Différentes représentations de l'observation d'une GUV (a) schéma illustratif, (b) en intensité, (c) en OPD, (d) en contraste de $\Delta\delta$ et (e) représentation de l'orientation locale de l'axe optique. Observation au grandissement 200 $\times$ , objectif 100 $\times$ , ON=1,3. Échelle = 8 $\mu\text{m}$ . . . . .	142
3.18	Imagerie d'une GUV marquée au di-8-ANEPPQ (a) en intensité, (b) en OPD, (c) en contraste de $\Delta\delta$ , et (d) représentation de l'orientation locale de l'axe optique. Observation au grandissement 200 $\times$ , objectif 100 $\times$ , ON=1,3. Échelle = 8 $\mu\text{m}$ . . . . .	143
3.19	Illustration de l'insertion de molécules fluorescentes au sein de (a) et orthogonalement à (b) la bi-couche lipidique . . . . .	144
3.20	Images en contraste (a) d'OPD, (b) de retard $\Delta\delta$ , avec (a1, a2) agrandissements des zones délimitées par les rectangles 1 & 2 de l'image (a), de retard (b1, b2) $\Delta\delta$ , et (c1, c2) orientation des zones délimitées par les rectangles en pointillés des images (b1) et (b2). L'échelle représente 6 $\mu\text{m}$ . (ON = 1,3 et grandissement total de 200 $\times$ ). . . . .	146

3.21	Cellules HT1080 Lifeact avec marquage GFP F-actine. Images (a) d'OPD, (b) de retard $\Delta\delta$ , (c) de fluorescence et (d) composite des images (b)&(c). L'échelle sur l'image représente 6 $\mu\text{m}$ . (ON=1,3 et grandissement total 200 $\times$ ).	148
4.1	Représentation schématique de l'effet sur l'imagerie de l'utilisation d'un éclairage oblique. . . . .	155
4.2	Représentation schématique d'un montage d'illumination de Köhler. (a) Cas d'une illumination incohérente qui peut être réalisée en ouvrant le diaphragme d'ouverture, (b) cas d'une illumination quasi-cohérente réalisée en fermant au maximum le diaphragme d'ouverture. . . . .	158
4.3	(a) Représentation schématique du support fréquentiel pour un angle d'illumination $\theta_{\text{illumination}}=0$ , (b) Coupe pour $K_{oy}/k_i = 0$ des supports fréquents par $K_{oz}/k_i$ pour des angles d'illumination valant $\theta_{\text{illumination}} = -\pi/2; 0; \pi/4$ en fonction des valeurs de $K_{ox}/k_i$ . . . . .	159
4.4	(a) Représentation schématique du support fréquentiel pour un angle d'illumination $\theta_{\text{illumination}}=0$ , (b) Coupe pour $K_{oy}/k_i = 0$ des supports fréquents par $K_{oz}/k_i$ pour des angles d'illumination valant $\theta_{\text{illumination}} \in [-\pi/2; 0; \pi/4]$ en fonction des valeurs de $K_{ox}/k_i$ et pour différentes valeurs de $\lambda$ . . . . .	161
4.5	Représentation schématique du contraste en intensité en fonction des fréquences spatiales pour trois degrés de cohérence de l'illumination différents.	162
4.6	Résultats de la simulation du filtrage par le microscope d'un objet d'intensité avec des illuminations de différents degrés de cohérence spatiale. (a) Représentation de l'objet d'intensité variant de façon sinusoidale et radiale, d'amplitude de modulation 1. Visualisation des FTM d'intensité et des images filtrées correspondantes pour 3 degrés de cohérence spatiale (0 (b); 0,5 (c) et 1 (d). . . . .	163
4.7	Illustration de l'augmentation d'épaisseur de la tranche $dz$ dans le cas d'une illumination oblique. . . . .	168
4.8	Contraste de l'interférogramme en fonction de la cohérence de l'illumination. (a) En noir plein : fonction de contraste théorique calculée à partir de l'équation 4.22. En carrés rouges : Mesures effectuées avec l'analyseur de front d'onde placé dans le plan image du microscope. (b) Visibilité des franges en fonction de l'étendue de la source au niveau du détecteur. . . . .	169
4.9	Imagerie d'une bille de polystyrène ( $n=1,581$ à $\lambda=700$ nm) immergée dans un milieu d'indice mesuré à 1,556. (a) interférogramme obtenu avec une illumination cohérente, (b) interférogramme obtenu avec une illumination incohérente, (c) profils réalisés sur les interférogrammes présentés en (a) en rouge et (b) en vert, (d) et (e) images d'OPD calculées respectivement à partir des interférogramme (a) et (b), (f) profils réalisés sur les images d'OPD (d) et (e). Observation à un grandissement de 250x. . . . .	171

## TABLE DES FIGURES

---

4.10	(a) images d'OPD sous illumination cohérente d'une bille de polystyrène de 5 $\mu\text{m}$ de diamètre immergée dans un milieu d'indice $n_{med} = 1,542$ . Haut : simulation et bas : expérience. (b) Images d'OPD sous illumination incohérente du même échantillon que pour les images (a). (c) Profils réalisés sur les différentes images d'OPD (Carrés noirs : points expérimentaux sous illumination cohérente (a, bas). Trait plein gris : résultat de la simulation (a, haut), carrés rouges : points expérimentaux sous illumination incohérente (b,bas). Trait bordeaux : résultat de la simulation (b, haut)). . . . .	172
4.11	Représentation des FTM simulées et théorique pour (a) $ON_{illumination} = ON_{collection} = 1,3$ et (b) $ON_{illumination}=1$ et $ON_{collection} = 1,3$ en fonction des fréquences spatiales. . . . .	173
4.12	FTM 3D visualisée dans le plan $(\nu_r, \nu_z)$ (en échelle logarithmique) avec $ON_{collection} = ON_{illumination} = 1,3$ . (b) OPD et (c) Intensité. (d) Représentation de la modulation d'amplitude en fonction des fréquences latérales $\nu_r$ normalisées grâce à des profils tracés sur (c) correspondant à $\nu_z=0$ (trait noir), $\nu_z= 4\%$ de $2ON_{collection}/\lambda$ (trait pointillé rouge), $\nu_z= 4\%$ de $2ON_{collection}/\lambda$ , $\nu_z$ (trait pointillé marron), $\nu_z= 20\%$ de $2ON_{collection}/\lambda$ (trait pointillé orange) et $\nu_z= 30\%$ de $2ON_{collection}/\lambda$ (trait pointillé vert). (d) Zoom de la courbe (c).174	174
4.13	(a) Représentation schématique du montage expérimental utilisé. Le diaphragme d'ouverture est conjugué avec la source et la pupille d'entrée de l'objectif et le diaphragme de champ est conjugué avec l'échantillon. (b) Représentation schématique de la réalisation d'un z-stack d'un échantillon. . . . .	176
4.14	Diagramme en blocs expliquant les différentes étapes de traitement menant de l'acquisition d'images à la détermination d'indice. Le trait en pointillés représente une étape encore non-réalisée. . . . .	177
4.15	Présentation des différentes images d'OPD d'une bille de polystyrène de 5 $\mu\text{m}$ de diamètre. Haut : coupes XY dans le plan $z=0$ et bas : coupes XZ en $y=0$ en illumination (a)cohérente, (b) incohérente, (c) incohérente avec déconvolution par FTM 3D. (d) Coupe XY dans le plan $z=0$ de l'image d'OPD incohérente avec déconvolution par FTM 2D. (e), (f) & (g) Profils suivant x et passant par le centre de la bille tracés sur les différentes images de coupe XZ (a) à (d). . . . .	179
4.16	Z-stack d'images d'OPD obtenues en illumination incohérente et déconvoluées grâce à une FTM3D. Visualisation des constituants présents dans les différents plans. Pas du z-stack = 0,2 $\mu\text{m}$ , grandissement 280x, $ON_{collection} = ON_{illumination}=1,3$ . Échelle = 5 $\mu\text{m}$ . . . . .	180
4.17	(a), (d) Stack d'images d'OPD déconvoluées à l'aide d'une FTM 3D et (b), (c) & (e), (f) coupes orthogonales suivant deux axes du stack respectivement au niveau d'une vésicule présente au sein de lamellipodes et au niveau d'un lamellipode de la cellule. Images de grandissement final 280x réalisées avec un objectif (100 x, $ON=1,3$ ) et un condenseur à immersion d' $ON=1,3$ . . . . .	181

4.18	Stack d'images d'OPD déconvoluées à l'aide d'une FTM 3D (a) brutes et (d) filtrées à l'aide d'un filtre passe haut. Coupes orthogonales suivant deux axes du stack d'images (b), (c) brutes et (e), (f) filtrées à l'aide d'un filtre passe haut au niveau d'une vésicule présente au sein de lamelipodes de la cellule. Images de grandissement final 280x réalisées avec un objectif (100 x, ON=1,3) et un condenseur à immersion d'ON=1,3. . . . .	182
4.19	(a),(b) & (c) Images d'OPD déconvoluées choisies à des profondeurs allant de 1 à 14 $\mu\text{m}$ . (b) image d'OPD déconvoluée au centre du z-stack. (d) Coupe orthogonale du stack suivant les traits en pointillés blancs. Le trait rouge représente la lamelle et le trait en pointillés vert représente la limite de l'échantillon. L'échelle représente 10 $\mu\text{m}$ . . . . .	184
4.20	(a) Schéma [142] représentant les différentes structures ainsi que leurs liaisons grâce au réseau de neurones au sein de l'hippocampe. sm : stratum moléculaire, sg : stratum granulosum, mf : fibres moussues, so : stratum oriens, sp : stratum pyramidale, sr : stratum radiatum, H : hile. Le gyrus denté est mis en évidence en rouge. (b) Image de microscopie confocale d'une coupe coronale de l'hippocampe (source : INSERM) Les axes du stiching représenté en (c) et du z-stack présenté dans la Figure suivante sont tracés sur l'image. (c) Stiching d'images d'OPD avec un objectif de grandissement 40x, ON=0,75 correspondant à une zone identique à celle mise en évidence sur la Figure (b). Les différents carrés sur l'image permettent de mettre en évidence des zones morphologiquement différentes au niveau du tissu. Échelle = 20 $\mu\text{m}$ . . . . .	186
4.21	(a) Représentation schématique d'un z-stack. (b) Images d'OPD non déconvoluées prises à des profondeurs de 6, 9 et 16 $\mu\text{m}$ , (c) Images d'OPD déconvoluée calculées à partir des zones entre pointillés des images d'OPD présentées en (b). Observation avec un grandissement 200x, $ON_{collection}=ON_{illumination}=1,3$ . Échelle=6 $\mu\text{m}$ . . . . .	187
4.22	(a) Série d'images d'OPD filtrées avec un filtre passe haut choisies et prises à des profondeurs d'imagerie différentes allant de 33 à 91 $\mu\text{m}$ , (b) Projection suivant la profondeur du maximum d'OPD. Observation au grandissement 100x, $ON_{collection}=ON_{illumination}=1,3$ . Échelle = 5 $\mu\text{m}$ . . . . .	188
4.23	Images d'OPD déconvoluées prises à des profondeurs d'imagerie différentes. Observation avec un grandissement 200x, $ON_{collection}=ON_{illumination}=1,3$ . Échelle=5 $\mu\text{m}$ . . . . .	190
4.24	schéma du montage expérimental permettant la correction du front d'onde en sortie du microscope. . . . .	191
4.25	Illustration schématique du principe de correction. (a) Image d'OPD originale comprenant un taux d'aberration $t_{ai}$ , (b) différentes images d'OPD avec différents taux d'aberrations appliqués, (c) courbe représentant la valeur d'une grandeur d'intérêt en fonction du taux d'aberration de chaque image. Le maximum de la fonction est obtenu lorsqu'on compense exactement les aberrations initiales du système optique. . . . .	192

## TABLE DES FIGURES

---

4.26	Images de neurones prises dans deux plans d'imagerie différents. Images d'OPD déconvoluée brute sans (a), (e) et avec (b), (f) correction, images d'OPD déconvoluée avec filtrage passe haut sans (c), (g) et avec (d), (h) correction acquises respectivement à une profondeur de 45,6 $\mu\text{m}$ et 53,4 $\mu\text{m}$ de la lamelle. Observation avec un grandissement 200x, $\text{ON}_{\text{collection}} = \text{ON}_{\text{illumination}} = 1,3$ . . . . .	193
A.1	Segmentation d'une image de différences de chemin optique obtenue sur des cellules COS-7 pour séparer les cellules du fond. (a) Image de différence de chemin optique. (b) Logarithme de l'amplitude du gradient de (a). (c) Seuillage automatique de l'image (b). (d) Dilatation morpho-mathématique de l'image (c), on sépare le fond des cellules. . . . .	200
A.2	Illustration de l'aplanissement du fond des images de différences de chemin optique par projection de la zone de fond détecté dans la figure A.1(c) sur une base de polynômes. (a) Image de différence de chemin optique de cellules COS-7. (b) Image (a) après aplanissement du fond. (c) Fond évalué par projection sur une base de polynômes d'ordre 8. (d) Visualisation du fond obtenu après aplanissement. . . . .	201
A.3	Segmentation des différentes cellules détectées. (a) Séparation des différents noyaux par érosions successives (b) Séparations des différentes cellules représentées en niveaux de gris. (c) Visualisation des contours des cellules. (d) Résultat de la segmentation finale. . . . .	202
B.1	(a) Volume optique/matière sèche en fonction de la surface de chaque levure d'une population de <i>S.cerevisiae</i> haploïde en pré-bourgeonnement ( <i>en carrés verts</i> ), en phase de bourgeonnement précoce ( <i>en carrés oranges</i> ) et pleinement bourgeonnantes ( <i>en carrés roses</i> ) en phases (a) exponentielle et (b) stationnaire. Représentation en diagramme de boîtes à moustaches des populations de <i>S. cerevisiae</i> haploïde (c) en croissance exponentielle et (d) en état stationnaire. Les boîtes représentent la médiane (trait centrale), le premier quartile (bas de la boîte), le dernier quartile (haut de la boîte), la moyenne (carré central), le 5 <sup>ème</sup> centile (patte du bas) et le 95 <sup>ème</sup> centile (patte du haut) des statistiques sur les différentes expériences. Observation avec un objectif 40x, $\text{ON}=0,75$ . Source blanche filtrée $\lambda=700 \pm 30 \text{ nm}$ . $3 \cdot 10^6$ cellules/ml. . . . .	204
B.2	Histogramme des mesures de <i>S. cerevisiae</i> haploïdes en culture (a) exponentielle et (b) phase stationnaire avec occurrences normalisées. Répartition (c) des 307 levures haploïdes en croissance exponentielle et (d) des 332 levures haploïdes en phase stationnaire en fonction de leur phase au sein du cycle. . . . .	206
B.3	Histogramme de comparaison de la masse occupée par le bourgeon de levures haploïdes dans des conditions de croissance différentes avec occurrences normalisées. . . . .	207

---

## Liste des tableaux

---

1.1	Tableau récapitulatif des caractéristiques des techniques de phase quantitative présentées. . . . .	34
2.1	Résultats obtenus de la mesure de l'échantillon de silice fondue. Observation au grandissement 80×. . . . .	42
2.2	Effet du grandissement sur les valeurs d'OPD obtenues grâce à la simulation numérique par <i>POC</i> . On compare les valeurs d'OPD à la valeur moyenne de 85,5 nm déterminée par la mesure sur 4 champs différents de l'échantillon. . . . .	45
2.3	Effet de l'ouverture numérique sur les valeurs d'OPD obtenues sur des images issues d'une simulation numérique par <i>POC</i> . On compare les valeurs d'OPD à la valeur moyenne de 85,5 nm déterminée par la mesure sur 4 champs différents de l'échantillon. . . . .	45
2.4	Tableau récapitulatif des résultats issus de l'étude de caractérisation de la mesure d'OPD. . . . .	46
2.5	Résultats obtenus de la mesure sur fibre optique. Les données "théoriques" ont été calculées à partir des données constructeur concernant le diamètre et les indices des différents composants de la fibre. L'OPD théorique est obtenue en réalisant le produit $dn \times \text{épaisseur}$ . . . . .	48
2.6	Erreur relative de segmentation. Comparaison des mesures de volume optique obtenues grâce à une segmentation manuelle et automatique réalisées respectivement par l'utilisateur et l'algorithme de segmentation automatique au volume optique théorique d'une bille de rayon $R$ variant de 2,5 $\mu\text{m}$ à 20 $\mu\text{m}$ . . . . .	54
2.7	Récapitulatif des mesures effectuées sur 2 séries de 100 images prises successivement et segmentées automatiquement. . . . .	56

## LISTE DES TABLEAUX

---

2.8	Influence de l'utilisation de différents grandissements sur la mesure de volume optique et de surface pour l'imagerie d'un échantillon de cellules HeLa fixées. . . . .	57
2.9	Synthèse des résultats de la mesure de masse sèche des 3 populations de <i>S.cerevisiae</i> diploïdes en phase de croissance exponentielle (noir) et en phase stationnaire (bleu). . . . .	74
2.10	Médiane des mesures de masse sèche en pg des différents types de levures étudiés. . . . .	76
2.11	Synthèse des résultats de la mesure de masse sèche de <i>S.cerevisiae</i> . . . . .	76
2.12	Synthèse des résultats de la mesure de masse sèche des 3 types de levures <i>S.pombe</i> en phase de croissance exponentielle. . . . .	80
2.13	Synthèse des résultats de comparaison des couples de levures filles de populations de <i>S.pombe</i> haploïdes et diploïdes en conditions de culture exponentielles. . . . .	81
2.14	Synthèse des résultats de la classification non supervisée des trois populations de <i>S.cerevisiae</i> diploïde en croissance exponentielle. . . . .	84
2.15	Synthèse des résultats de la classification supervisée des trois populations de <i>S.cerevisiae</i> diploïde en croissance exponentielle. . . . .	84
2.16	Synthèse des résultats de la classification non supervisée des populations de <i>S.cerevisiae</i> diploïde en croissance exponentielle avec et sans bourgeon. . . . .	85
2.17	Synthèse des résultats de la classification non supervisée des populations de <i>S. cerevisiae</i> diploïde en croissance exponentielle en phase S et phase (G2+M). . . . .	88
2.18	Synthèse des résultats de comparaison des pentes de croissance de levures <i>S.cerevisiae</i> diploïdes en croissance exponentielle et phase stationnaire entre les courbes échantillonnées correctement et sous échantillonnées. . . . .	94
2.19	Synthèse des résultats de la mesure de masse sèche des 2 populations de cellules de type HT1080 de contrôle et fluorescentes. . . . .	97
2.20	Synthèse des données relatives aux masses des constituants de la protéine TAG GFP. . . . .	98
2.21	Synthèse des résultats de la mesure de masse sèche des 2 populations de cellules COS-7 contrôles et marquées . . . . .	99
3.1	Étude de l'effet du choix des angles de polarisation et de leur répartition au niveau de la sinusoïde pour la réalisation du fit. Simulation réalisée pour des valeurs $\Delta\delta=22$ nm et $\theta_0=1$ rad. . . . .	129
3.2	Résultats des régressions linéaires obtenues pour les deux échantillons de $\Delta\delta$ en fonction de $(\delta_e + \delta_o)/2$ . . . . .	137
3.3	Tableau récapitulatif des résultats obtenus sur différentes fibres de collagène. Observation au grandissement 100x, ON=1,3. . . . .	139
4.1	Tableau récapitulatif des caractéristiques des techniques présentées dans le cadre d'une reconstruction d'échantillon. Les valeurs présentées sont les valeurs théoriques prenant en compte un indice de l'air et une longueur d'onde $\lambda$ de 633 nm. . . . .	157

B.1 Synthèse des résultats de la mesure de masse sèche des 3 populations de *S.cerevisiae* haploïdes en phase de croissance exponentielle (en noir) et stationnaire (en bleu). . . . . 205



---

## Bibliographie

---

- [1] F. Zernike, “Das phasenkontrastverfahren bei der mikroskopischen beobachtung,” *Z. Tech. Phys.*, vol. 16, pp. 454–457, 1935.
- [2] G. Nomarski, “Nouveau dispositif pour l’observation en contraste de phase differentiel,” *J. Phys. Radium*, 1955.
- [3] Z. Darzynkiewicz, F. Traganos, and M. R. Melamed, “New cell cycle compartments identified by multiparameter flow cytometry,” *Cytometry*, vol. 1, no. 2, pp. 98–108, 1980.
- [4] Z. Darzynkiewicz, F. Traganos, T. Sharpless, and M. R. Melamed, “Recognition of cells in mitosis by flow cytofluormetry.,” *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, vol. 25, no. 7, pp. 875–80, 1977.
- [5] H. A. Crissman, Z. Darzynkiewicz, R. A. Tobey, and J. A. Steinkamp, “Normal and perturbed chinese hamster ovary cells : correlation of dna, rna, and protein content by flow cytometry.,” *The Journal of Cell Biology*, vol. 101, no. 1, pp. 141–147, 1985.
- [6] G. G. Garzetti, A. Ciavattini, G. Goteri, M. D. Nictolis, and C. Romanini, “Proliferating cell nuclear antigen in endometrial carcinoma : Pretreatment identification of high-risk patients,” *Gynecologic Oncology*, vol. 61, no. 1, pp. 16 – 21, 1996.
- [7] D. Magde, E. Elson, and W. W. Webb, “Thermodynamic fluctuations in a reacting system—measurement by fluorescence correlation spectroscopy,” *Phys. Rev. Lett.*, vol. 29, pp. 705–708, Sep 1972.
- [8] A. Kress, X. Wang, H. Ranchon, J. Savatier, H. Rigneault, P. Ferrand, and S. Brasselet, “Mapping the local organization of cell membranes using excitation-polarization-resolved confocal fluorescence microscopy,” *Biophysical Journal*, vol. 105, no. 1, pp. 127–136, 2013.
- [9] E. Cuche, F. Bevilacqua, and C. Depeursinge, “Digital holography for quantitative phase-contrast imaging,” *Opt. Lett.*, vol. 24, pp. 291–293, Mar 1999.

- [10] B. Kemper and G. von Bally, "Digital holographic microscopy for live cell applications and technical inspection," *Appl. Opt.*, vol. 47, pp. A52–A61, Feb 2008.
- [11] G. Popescu, T. Ikeda, R. R. Dasari, and M. S. Feld, "Diffraction phase microscopy for quantifying cell structure and dynamics," *Opt. Lett.*, vol. 31, pp. 775–777, Mar 2006.
- [12] P. Bon, J. Savatier, M. Merlin, B. Wattellier, and S. Monneret, "Optical detection and measurement of living cell morphometric features with single-shot quantitative phase microscopy," *Journal of Biomedical Optics*, vol. 17, no. 7, pp. 076004–1–076004–7, 2012.
- [13] P. Marquet, B. Rappaz, P. J. Magistretti, E. Cuche, Y. Emery, T. Colomb, and C. Depeursinge, "Digital holographic microscopy : a noninvasive contrastimaging technique allowing quantitative visualization of living cells with subwavelength axial accuracy," *Opt. Lett.*, vol. 30, pp. 468–470, Mar 2005.
- [14] B. Kemper, P. Langehanenberg, and G. von Bally, "Digital holographic microscopy," *Optik & Photonik*, vol. 2, pp. 41–44, June 2007.
- [15] A. Bauwens, M. Bielaszewska, B. Kemper, P. Langehanenberg, G. von Bally, R. Reichelt, D. Mulac, H. U. Humpf, A. W. Friedrich, K. S. Kim, H. Karch, and J. MÜthing, "Differential cytotoxic actions of shiga toxin 1 and shiga toxin 2 on microvascular and macrovascular endothelial cells," *Thrombosis and Haemostasis*, vol. 105, no. 3, pp. 515–528, 2011.
- [16] P. Lenz, D. Bettenworth, P. Krausewitz, M. Bruckner, S. Ketelhut, G. von Bally, D. Domagk, and B. Kemper, "Digital holographic microscopy quantifies the degree of inflammation in experimental colitis," *Integr. Biol.*, vol. 5, pp. 624–630, 2013.
- [17] Y. Choi, T. D. Yang, K. J. Lee, and W. Choi, "Full-field and single-shot quantitative phase microscopy using dynamic speckle illumination," *Opt. Lett.*, vol. 36, pp. 2465–2467, Jul 2011.
- [18] C. Fang-Yen, S. Oh, Y. Park, W. Choi, S. Song, H. S. Seung, R. R. Dasari, and M. S. Feld, "Imaging voltage-dependent cell motions with heterodyne mach-zehnder phase microscopy," *Opt. Lett.*, vol. 32, pp. 1572–1574, Jun 2007.
- [19] W. Choi, C. Fang-Yen, K. Badizadegan, S. Oh, N. Lue, R. R. Dasari, and M. S. Feld, "Tomographic phase microscopy," *Nature Methods*, vol. 4, pp. 717 – 719, 2007.
- [20] K. Creath, "V phase-measurement interferometry techniques," in *Progress in Optics* (E. Wolf, ed.), vol. 26 of *Progress in Optics*, pp. 349 – 393, Elsevier, 1988.
- [21] B. Simon, M. Debailleul, A. Beghin, Y. Tourneur, and O. Haeberlé, "High-resolution tomographic diffractive microscopy of biological samples," *Journal of Biophotonics*, vol. 3, no. 7, pp. 462–467, 2010.
- [22] M. Debailleul, V. Georges, B. Simon, R. Morin, and O. Haeberlé, "High-resolution three-dimensional tomographic diffractive microscopy of transparent inorganic and biological samples," *Opt. Lett.*, vol. 34, no. 1, pp. 79–81, 2009.

- 
- [23] G. Maire, F. Drsek, J. Girard, H. Giovannini, A. Talneau, D. Konan, K. Belkebir, P. C. Chaumet, and A. Sentenac, “Experimental demonstration of quantitative imaging beyond abbe’s limit with optical diffraction tomography,” *Phys. Rev. Lett.*, vol. 102, p. 213905(4), May 2009.
- [24] Y. Park, G. Popescu, T. Ikeda, K. Badizadegan, R. R. Dasari, and M. S. Feld, “Diffraction phase microscopy,” in *Biomedical Optics*, p. TuI50, Optical Society of America, 2006.
- [25] B. Bhaduri, H. Pham, M. Mir, and G. Popescu, “Diffraction phase microscopy with white light,” *Opt. Lett.*, vol. 37, pp. 1094–1096, Mar 2012.
- [26] N. T. Shaked, “Quantitative phase microscopy of biological samples using a portable interferometer,” *Opt. Lett.*, vol. 37, pp. 2016–2018, Jun 2012.
- [27] G. Popescu, L. P. Deflores, J. C. Vaughan, K. Badizadegan, H. Iwai, R. R. Dasari, and M. S. Feld, “Fourier phase microscopy for investigation of biological structures and dynamics,” *Opt. Lett.*, vol. 29, pp. 2503–2505, Nov 2004.
- [28] S. Fürhapter, A. Jesacher, S. Bernet, and M. Ritsch-Marte, “Spiral phase contrast imaging in microscopy,” *Opt. Express*, vol. 13, pp. 689–694, Feb 2005.
- [29] S. Bernet, A. Jesacher, S. Fürhapter, C. Maurer, and M. Ritsch-Marte, “Quantitative imaging of complex samples by spiral phase contrast microscopy,” *Opt. Express*, vol. 14, pp. 3792–3805, May 2006.
- [30] J. Primot and L. Sogno, “Achromatic three-wave (or more) lateral shearing interferometer,” *J. Opt. Soc. Am. A*, vol. 12, no. 12, p. 2679, 1995.
- [31] B. Wattellier, J. Fuchs, J. P. Zou, K. Abdeli, C. Haefner, and H. P. Alpin, “High-power short-pulse laser repetition rate improvement by adaptive wave front correction,” *Review of Scientific Instruments*, vol. 75, no. 12, pp. 5186–5192, 2004.
- [32] B. Wattellier, J. Fuchs, J.-P. Zou, J.-C. Chanteloup, H. Bandulet, P. Michel, C. Labaune, S. Depierreux, A. Kudryashov, and A. Aleksandrov, “Generation of a single hot spot by use of a deformable mirror and study of its propagation in an underdense plasma,” *J. Opt. Soc. Am. B*, vol. 20, pp. 1632–1642, Aug 2003.
- [33] P. Bon, *Imagerie microscopique de champs électromagnétiques par interférométrie à décalage quadri-lateral. Application à la biologie. Thèse de Doctorat.*, vol. Chapitre 2 "Interprétation d’images de phase en régime projectif au niveau de l’objet". 2011.
- [34] J. Primot and N. Guérineau, “Extended hartmann test based on the pseudoguiding property of a hartmann mask completed by a phase chessboard,” *Appl. Opt.*, vol. 39, pp. 5715–5720, Nov 2000.
- [35] S. Velghe, J. Primot, N. Guérineau, M. Cohen, and B. Wattellier, “Wave-front reconstruction from multidirectional phasederivatives generated by multilateral shearing interferometers,” *Opt. Lett.*, vol. 30, pp. 245–247, Feb 2005.
- [36] C. Shannon, “A mathematical theory of communication,” *Bell System Technical Journal*, vol. 27, pp. 379–423, 623–656, 1948.

- [37] B. Bhaduri, K. Tangella, and G. Popescu, “Fourier phase microscopy with white light,” *Biomed. Opt. Express*, vol. 4, pp. 1434–1441, Aug 2013.
- [38] M. R. Arnison, K. G. Larkin, C. J. R. Sheppard, N. I. Smith, and C. J. Cogswell, “Linear phase imaging using differential interference contrast microscopy,” *Journal of Microscopy*, vol. 214, no. 1, pp. 7–12, 2004.
- [39] D. D. Duncan, D. G. Fischer, A. Dayton, and S. A. Prahl, “Quantitative carré differential interference contrast microscopy to assess phase and amplitude,” *J. Opt. Soc. Am. A*, vol. 28, pp. 1297–1306, Jun 2011.
- [40] A. B. Parthasarathy, K. K. Chu, T. N. Ford, and J. Mertz, “Quantitative phase imaging using a partitioned detection aperture,” *Opt. Lett.*, vol. 37, pp. 4062–4064, Oct 2012.
- [41] P. Bon, G. Maucort, B. Wattellier, and S. Monneret, “Quadriwave lateral shearing interferometry for quantitative phase microscopy of living cells,” *Opt. Express*, vol. 17, pp. 13080–13094, Jul 2009.
- [42] G. Binnig, C. F. Quate, and C. Gerber, “Atomic force microscope,” *Phys. Rev. Lett.*, vol. 56, pp. 930–933, Mar 1986.
- [43] P. Bon, B. Wattellier, and S. Monneret, “Modeling quantitative phase image formation under tilted illuminations,” *Opt. Lett.*, vol. 37, no. 10, pp. 1718–1720, 2012.
- [44] H. Sierra, C. A. DiMarzio, and D. H. Brooks, “Modeling phase microscopy of transparent three-dimensional objects : a product-of-convolutions approach,” *J. Opt. Soc. Am. A*, vol. 26, no. 5, pp. 1268–1276, 2009.
- [45] I. H. Malitson, “Interspecimen comparison of the refractive index of fused silica,” *J. Opt. Soc. Am.*, vol. 55, pp. 1205–1208, Oct 1965.
- [46] L. WEISS, “The effects of trypsin on the size, viability and dry mass of sarcoma 37 cells,” *Experimental cell research*, vol. 10.1016/0014-4827(58)90214-3, 1958.
- [47] B. Rappaz, E. Cano, T. Colomb, V. S. Jonas Kühn, P. J. Magistretti, P. Marquet, and C. Depeursinge, “Noninvasive characterization of the fission yeast cell cycle by monitoring dry mass with digital holographic microscopy,” *J. Biomed. Opt.*, vol. 14, no. 1083-3668 (Linking), p. 034049., 2009.
- [48] P. Girshovitz and N. T. Shaked, “Generalized cell morphological parameters based on interferometric phase microscopy and their application to cell life cycle characterization,” *Biomed. Opt. Express*, vol. 3, no. 8, pp. 1757–1773, 2012.
- [49] T. A. Zangle, D. Burnes, C. Mathis, O. N. Witte, and M. A. Teitell, “Quantifying biomass changes of single cd8+ t cells during antigen specific cytotoxicity,” *PLoS ONE*, vol. 8, pp. e68916–, July 2013.
- [50] T. A. Zangle, J. Chun, J. Zhang, J. Reed, and M. A. Teitell, “Quantification of biomass and cell motion in human pluripotent stem cell colonies,” *Biophys J*, vol. 105, pp. 593–601, Aug. 2013.
- [51] R. Barer, “Interference microscopy and mass determination,” *Nature*, vol. 169, pp. 366–367, Mar. 1952.

- 
- [52] L. E. H. Whitby and C. J. C. Britton, *Disorders of the blood. Diagnosis : pathology : treatment : technique. 1950 pp. xii + 759 pp.* J. and A. Churchill, Ltd., London, 1950.
- [53] S. D. Talia, J. M. Skotheim, J. M. Bean, E. D. Siggia, and F. R. Cros, “The effects of molecular noise and size control on variability in the budding yeast cell cycle.,” *Nature*, vol. 448, no. 0028-0836), pp. 947–951, 2007.
- [54] G. Michel, D. Francisco F., S. Sungmin, G. William H., B. Andrea K., T. Amit, J. Paul, P. Kris, G. Alan D., K. Marc W., and M. Scott R., “Using buoyant mass to measure the growth of single cells,” *Nature Methods*, vol. 7, pp. 387–390, 2010.
- [55] S. Son, A. Tzur, Y. Weng, P. Jorgensen, J. Kim, M. W. Kirschner, and S. R. Manalis, “Direct observation of mammalian cell growth and size regulation,” *Nat Meth*, vol. 9, pp. 910–912, Sept. 2012.
- [56] F. Feijó Delgado, N. Cermak, V. C. Hecht, S. Son, Y. Li, S. M. Knudsen, S. Olcum, J. M. Higgins, J. Chen, W. H. Grover, and S. R. Manalis, “Intracellular water exchange for measuring the dry mass, water mass and changes in chemical composition of living cells.,” *PLoS ONE*, vol. 8, p. e67590, 2013.
- [57] J. H. Gladstone and T. P. Dale, “Researches on the refraction, dispersion, and sensitiveness of liquids,” *Philosophical Transactions of the Royal Society of London*, vol. 153, pp. 317–343, 1863.
- [58] D. P. Lide, ed., *CRC Handbook of Chemistry and Physics*. CRC PRESS, 81 ed., 2000.
- [59] B. S. Chincholi, A. J. Havlik, and R. D. Vold, “Specific refractive index increments of polymer systems at four wavelengths,” *Journal of Chemical & Engineering Data*, vol. 19, no. 2, pp. 148–152, 1974.
- [60] M. Bennett, J. Heslop-Harrison, J. Smith, and J. Ward, “Dna density in mitotic and meiotic metaphase chromosomes of plants and animals,” *J Cell Sci*, vol. 63, no. 1, pp. 173–179, 1983.
- [61] G. Adair and M. Robinson, “The specific refraction increments of serum-albumin and serum-globulin,” *Biochemical Journal*, vol. 24(4), pp. 993–1011, 1930.
- [62] L. Vincent and P. Soille, “Watersheds in digital spaces : an efficient algorithm based on immersion simulations,” *IEEE transactions on pattern analysis and machine intelligence*, vol. 13, no. 6, pp. 583–598, 1991.
- [63] G. Popescu, Y. Park, W. Choi, R. R. Dasari, M. S. Feld, and K. Badizadegan, “Imaging red blood cell dynamics by quantitative phase microscopy,” *Blood Cells, Molecules, and Diseases*, vol. 41, no. 1, pp. 10 – 16, 2008.
- [64] K. G. Phillips, S. L. Jacques, and O. J. T. McCarty, “Measurement of single cell refractive index, dry mass, volume, and density using a transillumination microscope,” *Physical review letters*, vol. 109, p. 118105, September 2012.
- [65] B. Rappaz, A. Barbul, A. Hoffmann, D. Boss, R. Korenstein, C. Depeursinge, P. J. Magistretti, and P. Marquet, “Spatial analysis of erythrocyte membrane fluctuations

## BIBLIOGRAPHIE

---

- by digital holographic microscopy,” *Blood Cells, Molecules, and Diseases*, vol. 42, no. 3, pp. 228 – 232, 2009.
- [66] H. B. Mann and D. R. Whitney, “On a Test of Whether one of Two Random Variables is Stochastically Larger than the Other,” *The Annals of Mathematical Statistics*, vol. 18, no. 1, pp. 50–60, 1947.
- [67] K. J. McManus and M. J. Hendzel, “Atm-dependent dna damage-independent mitotic phosphorylation of h2ax in normally growing mammalian cells,” *Molecular Biology of the Cell*, vol. 16, no. 10, pp. 5013–5025, 2005.
- [68] J. Savatier, J. Vigo, and J.-M. Salmon, “Monitoring cell cycle distributions in living cells by videomicrofluorometry and discriminant factorial analysis,” *Cytometry Part A*, vol. 56A, no. 1, pp. 8–14, 2003.
- [69] F. Sherman, “Getting started with yeast,” *Methods Enzymol.*, vol. 350, pp. 3–41, 2002.
- [70] J. Jackman and P. M. O’Connor, “Methods for synchronizing cells at specific stages of the cell cycle.,” *Current protocols in cell biology*, vol. Chapter 8, pp. 8.3.1–8.3.20, May 2001.
- [71] L. cycle of the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*., “I herskowitz,” *Microbiol Rev.*, vol. 52(4), p. 536–553, Dec 1988.
- [72] J. Mitchison and P. Nurse, “Growth in cell length in the fission yeast *schizosaccharomyces pombe*,” *Journal of Cell Science*, vol. 75, no. 1, pp. 357–376, 1985.
- [73] M. Piel, P. Meyer, A. Khodjakov, C. L. Rieder, and M. Bornens, “The respective contributions of the mother and daughter centrioles to centrosome activity and behavior in vertebrate cells,” *The Journal of Cell Biology*, vol. 149, no. 2, pp. 317–330, 2000.
- [74] A. C. Spradling and Y. Zheng, “The mother of all stem cells?,” *Science*, vol. 315, no. 5811, pp. 469–470, 2007.
- [75] W. Chia, W. G. Somers, and H. Wang, “*Drosophila* neuroblast asymmetric divisions : cell cycle regulators, asymmetric protein localization, and tumorigenesis,” *The Journal of Cell Biology*, vol. 180, no. 2, pp. 267–272, 2008.
- [76] J. A. K. Ralph A. Neumüller, “Dividing cellular asymmetry : asymmetric cell division and its implications for stem cells and cancer,” *Genes & Development*, vol. 23, p. 2675–2699, 2009.
- [77] J. Chant, “Cell polarity in yeast,” *Annual review of cell and developmental biology*, vol. 15, no. 1, pp. 365–391, 1999.
- [78] H. Horvitz and I. Herskowitz, “Mechanisms of asymmetric cell division : Two bs or not two bs, that is the question,” *Cell*, vol. 68, no. 2, pp. 237 – 255, 1992.
- [79] J. A. Hartigan and M. A. Wong, “A k-means clustering algorithm,” *Applied Statistics*, vol. Vol. 28, No. 1, pp. pp. 100–108, 1979.

- 
- [80] S. Bayne-Jones and E. F. Adolph, "Growth in size of micro-organisms measured from motion pictures i. yeast, *saccharomyces cerevisiae*," *Journal of Cellular and Comparative Physiology*, vol. 1, no. 3, pp. 387–407, 1932.
- [81] C. Lindegren and S. Haddad, "Growth rates of individual yeast cells," *Genetica*, vol. 27, no. 1, pp. 45–53, 1955.
- [82] J. Mitchison, "The growth of single cells : Ii. *saccharomyces cerevisiae*," *Experimental Cell Research*, vol. 15, no. 1, pp. 214 – 221, 1958.
- [83] B. Johnson and E. J. Gibson, "Autoradiographic analysis of regional cell wall growth of yeasts : Iii. *saccharomyces cerevisiae*," *Experimental Cell Research*, vol. 41, no. 3, pp. 580 – 591, 1966.
- [84] J. Riedl, A. H. Crevenna, K. Kessenbrock, J. H. Yu, D. Neukirchen, M. Bista, F. Bradke, D. Jenne, T. A. Holak, Z. Werb, M. Sixt, and R. Wedlich-Soldner, "Lifeact : a versatile marker to visualize f-actin," *Nat Meth*, vol. 5, pp. 605–607, July 2008.
- [85] S. Huard, *Polarisation de la lumière*. 1994.
- [86] C. E. Goldstein, Dennis H., *Polarized light*, Dennis Goldstein. CRC Press : Boca Raton, array ed., 2003.
- [87] S.-Y. Lu and R. A. Chipman, "Interpretation of mueller matrices based on polar decomposition," *J. Opt. Soc. Am. A*, vol. 13, pp. 1106–1113, May 1996.
- [88] D. A. Fletcher and R. D. Mullins, "Cell mechanics and the cytoskeleton," *Nature*, vol. 463, pp. 485–492, Jan. 2010.
- [89] C. Luparello, "Aspects of collagen changes in breast cancer," *Journal of Carcinogenesis & Mutagenesis*, 2013.
- [90] A. Pierangelo, A. Benali, M.-R. Antonelli, T. Novikova, P. Validire, B. Gayet, and A. D. Martino, "Ex-vivo characterization of human colon cancer by mueller polarimetric imaging," *Opt. Express*, vol. 19, pp. 1582–1593, Jan 2011.
- [91] M. W. Conklin, J. C. Eickhoff, K. M. Riching, C. A. Pehlke, K. W. Eliceiri, P. P. Provenzano, A. Friedl, and P. J. Keely, "Aligned collagen is a prognostic signature for survival in human breast carcinoma," *The American Journal of Pathology*, vol. 178, pp. 1221–1232, Mar. 2011.
- [92] R. Oldenbourg, "A new view on polarization microscopy," *Nature*, vol. 381, p. 811–812, 1996.
- [93] M. S. Shalin Mehta and R. Oldenbourg, "Polarized light imaging of birefringence and diattenuation at high resolution and high sensitivity," *Journal of Optics*, vol. 15, no. 9, 2013.
- [94] S. Sugita and T. Matsumoto, "Quantitative measurement of the distribution and alignment of collagen fibers in unfixed aortic tissues," *Journal of Biomechanics*, vol. 46, pp. 1403–1407, Apr. 2013.

- [95] F. Massoumian, R. Juskaitytis, M. A. A. Neil, and T. Wilson, “Quantitative polarized light microscopy,” *Journal of Microscopy*, vol. 209, no. 1, pp. 13–22, 2003.
- [96] H. Nakaji, N. Kouyama, Y. Muragaki, Y. Kawakami, and H. Iseki, “Localization of nerve fiber bundles by polarization-sensitive optical coherence tomography,” *Journal of Neuroscience Methods*, vol. 174, pp. 82–90, Sept. 2008.
- [97] C. Fan and G. Yao, “Imaging myocardial fiber orientation using polarization sensitive optical coherence tomography,” *Biomed. Opt. Express*, vol. 4, no. 3, pp. 460–465, 2013.
- [98] P. Terrier, J. M. Charbois, and V. Devlaminck, “Fast-axis orientation dependence on driving voltage for a stokes polarimeter based on concrete liquid-crystal variable retarders,” *Appl. Opt.*, vol. 49, pp. 4278–4283, Aug 2010.
- [99] J. L. Pezzaniti and R. A. Chipman, “Mueller matrix imaging polarimetry,” *Optical engineering*, vol. vol.34, pp. 1558–1568, 1995.
- [100] A. De Martino, Y.-K. Kim, E. Garcia-Caurel, B. Laude, and B. Drévilion, “Optimized mueller polarimeter with liquid crystals,” *Optics Letters*, vol. 28, p. 8, 2003.
- [101] B. Laude-Boulesteix, A. D. Martino, B. Drévilion, and L. Schwartz, “Mueller polarimetric imaging system with liquid crystals,” *Appl. Opt.*, vol. 43, pp. 2824–2832, May 2004.
- [102] T. Novikova, A. Pierangelo, A. D. Martino, A. Benali, and P. Validire, “Polarimetric imaging for cancer diagnosis and staging,” *Optics and Photonics News*, 2012.
- [103] Y. Kim, J. Jeong, J. Jang, M. W. Kim, and Y. Park, “Polarization holographic microscopy for extracting spatio-temporally resolved jones matrix,” *Opt. Express*, vol. 20, pp. 9948–9955, Apr 2012.
- [104] Z. Wang, L. J. Millet, M. U. Gillette, and G. Popescu, “Jones phase microscopy of transparent and anisotropic samples,” *Opt. Lett.*, vol. 33, pp. 1270–1272, Jun 2008.
- [105] T. Tahara, Y. Awatsuji, Y. Shimozato, T. Kakue, K. Nishio, S. Ura, T. Kubota, and O. Matoba, “Single-shot polarization-imaging digital holography based on simultaneous phase-shifting interferometry,” *Opt. Lett.*, vol. 36, pp. 3254–3256, Aug 2011.
- [106] S.-Y. Lu and R. A. Chipman, “Homogeneous and inhomogeneous jones matrices,” *J. Opt. Soc. Am. A*, vol. 11, pp. 766–773, Feb 1994.
- [107] N. M. Dragomir, X. M. Goh, C. L. Curl, L. M. D. Delbridge, and A. Roberts, “Quantitative polarized phase microscopy for birefringence imaging,” *Opt. Express*, vol. 15, pp. 17690–17698, Dec 2007.
- [108] N. Dragomir and A. Roberts, “Orientation independent retardation imaging using quantitative polarized phase microscopy,” *Microscopy Research and Technique*, pp. n/a–n/a, 2012.
- [109] I. H. Shin, S.-M. Shin, and D. Y. Kim, “New, simple theory-based, accurate polarization microscope for birefringence imaging of biological cells,” *Journal of Biomedical Optics*, vol. 15, no. 1, pp. 016028–016028–6, 2010.

- 
- [110] J. K. J Rheims and T. Wriedt, "Refractive-index measurements in the near-ir using an abbe refractometer," *J Rheims et al 1997 Meas. Sci. Technol.*, vol. 8, p. 601, 1997.
- [111] F. P. Bolin, L. E. Preuss, R. C. Taylor, and R. J. Ference, "Refractive index of some mammalian tissues using a fiber optic cladding method," *Appl. Opt.*, vol. 28, pp. 2297–2303, Jun 1989.
- [112] H. M. Kim, H.-J. Choo, S.-Y. Jung, Y.-G. Ko, W.-H. Park, S.-J. Jeon, C. H. Kim, T. Joo, and B. R. Cho, "A two-photon fluorescent probe for lipid raft imaging : C-laurdan," *ChemBioChem*, vol. 8, no. 5, pp. 553–559, 2007.
- [113] A. Gidwani, D. Holowka, and B. Baird, "Fluorescence anisotropy measurements of lipid order in plasma membranes and lipid rafts from rbl-2h3 mast cells," *Biochemistry*, vol. 40, no. 41, pp. 12422–12429, 2001. PMID : 11591163.
- [114] M. I. Angelova and D. S. Dimitrov, "Liposome electroformation," *Faraday Discuss. Chem. Soc.*, vol. 81, pp. 303–311, 1986.
- [115] Y. Gluzman, "Sv40-transformed simian cells support the replication of early sv40 mutants," *Cell*, vol. 23, pp. 175–182, 1981.
- [116] F. Pampaloni, E. G. Reynaud, and E. H. K. Stelzer, "The third dimension bridges the gap between cell culture and live tissue," *Nat Rev Mol Cell Biol*, vol. 8, pp. 839–845, Oct. 2007.
- [117] M. J. Nasse, J. C. Woehl, and S. Huant, "High-resolution mapping of the three-dimensional point spread function in the near-focus region of a confocal microscope," *Applied Physics Letters*, vol. 90, no. 3, pp. –, 2007.
- [118] S. W. Hell and J. Wichmann, "Breaking the diffraction resolution limit by stimulated emission : stimulated-emission-depletion fluorescence microscopy," *Opt. Lett.*, vol. 19, pp. 780–782, Jun 1994.
- [119] M. J. Rust, M. Bates, and X. Zhuang, "Stochastic optical reconstruction microscopy (storm) provides sub-diffraction-limit image resolution," *Nature methods*, vol. 3, no. 10, p. 793, 2006.
- [120] E. Betzig, G. H. Patterson, R. Sougrat, O. W. Lindwasser, S. Olenych, J. S. Bonifacino, M. W. Davidson, J. Lippincott-Schwartz, and H. F. Hess, "Imaging intracellular fluorescent proteins at nanometer resolution," *Science*, vol. 313, no. 5793, pp. 1642–1645, 2006.
- [121] B. Huang, W. Wang, M. Bates, and X. Zhuang, "Three-dimensional super-resolution imaging by stochastic optical reconstruction microscopy," *Science*, vol. 319, no. 5864, pp. 810–813, 2008.
- [122] S. Quirin, S. R. P. Pavani, and R. Piestun, "Optimal 3d single-molecule localization for superresolution microscopy with aberrations and engineered point spread functions," *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 109, no. 3, pp. 675–679, 2012.
- [123] M. F. Juetten, T. J. Gould, M. D. Lessard, M. J. Mlodzianoski, B. S. Nagpure, B. T. Bennett, S. T. Hess, and J. Bewersdorf, "Three-dimensional sub-100 nm resolution fluorescence microscopy of thick samples," *Nat Meth*, vol. 5, pp. 527–529, June 2008.

- [124] A. Dubois, K. Grieve, G. Moneron, R. Lecaque, L. Vabre, and C. Boccara, “Ultra-high-resolution full-field optical coherence tomography,” *Appl. Opt.*, vol. 43, pp. 2874–2883, May 2004.
- [125] E. Dalimier and D. Salomon, “Full-field optical coherence tomography : A new technology for 3d high-resolution skin imaging,” *Dermatology*, vol. 224, no. 1, pp. 84–92, 2012.
- [126] D. Matthieu, S. Bertrand, G. Vincent, H. Olivier, and L. Vincent, “Holographic microscopy and diffractive microtomography of transparent samples,” *Measurement Science and Technology*, vol. 19, 2008.
- [127] Y. Ruan, P. Bon, E. Mudry, G. Maire, P. C. Chaumet, H. Giovannini, K. Belkebir, A. Talneau, B. Wattellier, S. Monneret, and A. Sentenac, “Tomographic diffractive microscopy with a wavefront sensor,” *Opt. Lett.*, vol. 37, pp. 1631–1633, May 2012.
- [128] G. Maire, F. Drsek, J. Girard, H. Giovannini, A. Talneau, D. Konan, K. Belkebir, P. C. Chaumet, and A. Sentenac, “Experimental demonstration of quantitative imaging beyond abbe’s limit with optical diffraction tomography,” *Phys. Rev. Lett.*, vol. 102, p. 213905, May 2009.
- [129] C. Yann, T. Fatih, J. Pascal, P. Nicolas, B. Daniel, M. Pierre, M. Pierre, and D. Christian, “Marker-free phase nanoscopy,” *Nature Photonics Letters*, vol. 7, 2013.
- [130] B. Simon, *Application des techniques de déconvolution multinoyaux et de tomographie diffractive optique à l’amélioration de l’imagerie microscopique 2D et 3D. Thèse de Doctorat.* 2007.
- [131] V. Westphal and S. W. Hell, “Nanoscale resolution in the focal plane of an optical microscope,” *Physical review letters*, vol. 94, no. 14, p. 143903, 2005.
- [132] K. Xu, H. P. Babcock, and X. Zhuang, “Dual-objective storm reveals three-dimensional filament organization in the actin cytoskeleton,” *Nat Meth*, vol. 9, pp. 185–188, Feb. 2012.
- [133] S. S. Kou, L. Waller, G. Barbastathis, and C. J. R. Sheppard, “Transport-of-intensity approach to differential interference contrast (ti-dic) microscopy for quantitative phase imaging,” *Opt. Lett.*, vol. 35, pp. 447–449, Feb 2010.
- [134] K. G. Phillips, S. L. Jacques, and O. J. T. McCarty, “Measurement of single cell refractive index, dry mass, volume, and density using a transillumination microscope,” *Phys. Rev. Lett.*, vol. 109, p. 118105, Sep 2012.
- [135] E. Wolf, “Three-dimensional structure determination of semi-transparent objects from holographic data,” *Opt. Commun.*, vol. 1, pp. 153–156, 1969.
- [136] M. Born and E. Wolf, *Principles of Optics*. Cambridge University Press, 1999.
- [137] M.-H. Philip McCord Morse, Herman Feshbach, *Methods of theoretical physics*. Science, 1953.
- [138] S. Yongjin, C. Wonshik, F.-Y. Christopher, B. Kamran, D. Ramachandra, and M. S. Feld, “Optical diffraction tomography for high resolution live cell imaging,” *Optics express*, vol. 17, 2009.

- [139] P. Bon, S. Aknoun, S. Monneret, and B. Wattellier, “Enhanced 3d spatial resolution in quantitative phase microscopy using spatially incoherent illumination,” *Opt. Express*, vol. 22, pp. 8654–8671, Apr 2014.
- [140] P. J. Verveer, *Computational and Optical methods for improving resolution and signal quality in fluorescence microscopy. Thèse de Doctorat.* 1998.
- [141] N. Wiener, *Extrapolation, Interpolation, and Smoothing of Stationary Time Series.* The MIT Press, 1964.
- [142] N. TONI, *Modifications morphologiques associées à la plasticité synaptique.* Thèse présentée à la Faculté des Sciences de l’Université de Genève., 2000.
- [143] D. Débarre, E. J. Botcherby, T. Watanabe, S. Srinivas, M. J. Booth, and T. Wilson, “Image-based adaptive optics for two-photon microscopy,” *Opt. Lett.*, vol. 34, pp. 2495–2497, Aug 2009.
- [144] J. Zeng, P. Mahou, M.-C. Schanne-Klein, E. Beaurepaire, and D. Débarre, “3d resolved mapping of optical aberrations in thick tissues,” *Biomed. Opt. Express*, vol. 3, pp. 1898–1913, Aug 2012.

## BIBLIOGRAPHIE

---