

Physique de la réflexion totale interne et expression du champ évanescent

Considérons une interface entre deux milieux d'indices respectifs n_i pour le milieu incident et n_t pour le second milieu. D'une manière générale, un rayon incident à cet interface suit les lois de la réfraction de Snell-Descartes, i.e. :

$$n_i \sin(\theta_i) = n_t \sin(\theta_t) \quad (1)$$

Un phénomène de réflexion totale interne peut se produire à cette interface lorsque $n_i > n_t$. Dans ces conditions, le rayon réfracté s'écarte de la normale (figure 3-1).

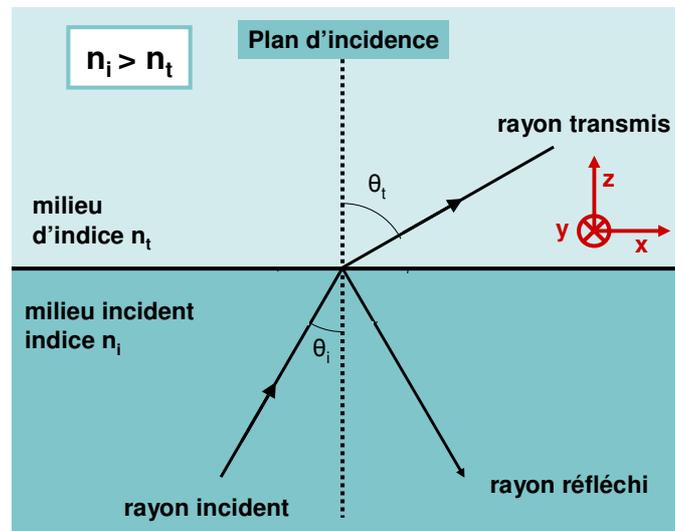


Figure 3-1 : schéma de principe et définition des notations.

Au fur et à mesure que θ_i augmente, le rayon transmis se rapproche de l'interface, et de plus en plus d'énergie est transférée au rayon réfléchi. On conçoit ainsi qu'à partir d'une certaine valeur de l'angle incident, le rayon transmis n'aura plus de réalité et que toute l'énergie sera réfléchi dans le milieu initial. Ceci se produira pour des valeurs d'angle d'incidence θ_i supérieures à l'angle critique θ_c défini par :

$$n_i \sin(\theta_c) = n_t \sin\left(\frac{\pi}{2}\right)$$

$$\sin(\theta_c) = \frac{n_t}{n_i} \quad (2)$$

C'est dans ce cas que l'on parle de réflexion totale interne. Les équations de Maxwell imposant des conditions de continuité, une petite partie du champ est transmise au second milieu et reste confinée à proximité de l'interface [Hecht 2002], [Axelrod 2005].

Soit $(\vec{x}, \vec{y}, \vec{z})$ un repère orthonormale direct : (\vec{x}, \vec{z}) définit le plan d'incidence et (\vec{x}, \vec{y}) définit le plan de l'interface (figure 3-1). Considérons une onde plane propagative dans le milieu homogène d'indice n_i , incidente avec un angle θ_i par rapport à la normale à l'interface plane diélectrique avec le milieu d'indice n_t .

Toujours d'après la loi de Snell-Descartes (1), on peut exprimer le cosinus de l'angle formé par le rayon transmis avec la normale par :

$$\begin{aligned}\cos^2(\theta_t) &= 1 - \sin^2(\theta_i) \\ \cos^2(\theta_t) &= 1 - \left(\frac{n_i}{n_t}\right)^2 \sin^2(\theta_i)\end{aligned}\quad (3)$$

Dans la configuration de réflexion totale, on a :

$$0 < \theta_c < \theta_i < \frac{\pi}{2}$$

Ce qui se traduit par :

$$0 < \sin(\theta_c) = \frac{n_t}{n_i} < \sin(\theta_i)$$

et donc,

$$1 < \left(\frac{n_i}{n_t}\right)^2 \sin^2(\theta_i)$$

Par conséquent, d'après (3), le cosinus de l'angle transmis est imaginaire pur et vaut :

$$\cos(\theta_t) = \pm i \sqrt{\left(\frac{n_i}{n_t}\right)^2 \sin^2(\theta_i) - 1}\quad (4)$$

Avec une onde incidente plane d'amplitude A , la solution des équations de Maxwell pour le champ électrique transmis dans le milieu d'indice n_t peut être écrite :

$$\vec{E}_t = A\vec{E}_{t0} \exp[i(\vec{k}_t \cdot \vec{x} - \omega t)]$$

avec \vec{k}_t le vecteur d'onde dans le milieu d'indice n_t , de norme $k_t = \frac{2\pi n_t}{\lambda_0}$ où λ_0 est la longueur

d'onde dans le vide. En développant et en introduisant l'angle de réfraction θ_t dans l'écriture, on obtient :

$$\begin{aligned}\vec{E}_t &= A\vec{E}_{t0} \exp[i(k_{tx}x + k_{tz}z - \omega t)] \\ \vec{E}_t &= A\vec{E}_{t0} \exp[i(k_t \sin(\theta_t)x + k_t \cos(\theta_t)z - \omega t)]\end{aligned}$$

Puis, en utilisant (4),

$$\vec{E}_t = A\vec{E}_{t0} \exp\left[i\left(k_t \frac{n_i}{n_t} \sin(\theta_i) \times x - \omega t\right)\right] \times \exp\left[\pm k_t \sqrt{\left(\frac{n_i}{n_t}\right)^2 \sin^2(\theta_i) - 1} \times z\right]$$

Seule la solution avec un argument de l'exponentielle réel négatif convient physiquement (sinon l'amplitude tend vers l'infini avec z), donc :

$$\vec{E}_t = A\vec{E}_{t0} \exp\left[i\left(k_t \frac{n_i}{n_t} \sin(\theta_i) \times x - \omega t\right)\right] \times \exp\left[-k_t \sqrt{\left(\frac{n_i}{n_t}\right)^2 \sin^2(\theta_i) - 1} \times z\right]$$

Ainsi l'onde résultante se propage suivant x , c'est-à-dire parallèlement à la surface et décroît exponentiellement suivant z . Une telle onde est par conséquent **évanescence**. En terme d'intensité, on a :

$$I_t(z) = I_0 \times \exp\left[-2k_t \sqrt{\left(\frac{n_i}{n_t}\right)^2 \sin^2(\theta_i) - 1} \times z\right]$$

$$I_t(z) = I_0 \times \exp\left(-\frac{z}{d}\right)$$

$$\text{avec } d = \frac{1}{2k_t \sqrt{\left(\frac{n_i}{n_t}\right)^2 \sin^2(\theta_i) - 1}} = \frac{\lambda_0}{2 \times 2\pi n_t \times \sqrt{\left(\frac{n_i}{n_t}\right)^2 \sin^2(\theta_i) - 1}}$$

$$\text{c'est-à-dire } d = \frac{\lambda_0}{4\pi \times \sqrt{n_i^2 \sin^2(\theta_i) - n_t^2}}.$$

Cette longueur, caractéristique de la décroissance de l'intensité, est appelée **profondeur de pénétration** du champ évanescent [Born 1975], [Oheim 2005]. Par exemple, pour $n_i = 1,50$, $n_t = 1,38$, $\lambda_0 = 480 \text{ nm}$ et $\theta_i = 69^\circ$ (ces valeurs correspondent aux valeurs expérimentales utilisées dans la suite), on obtient $d = 161 \text{ nm}$, ce qui est inférieur à la longueur d'onde d'excitation.

En partant des équations de Fresnel, qui donnent le rapport entre les champs électriques transmis et incident, il est possible de calculer les composantes du champ électrique évanescent dans le repère $(\vec{x}, \vec{y}, \vec{z})$ (avec $\theta_i > \theta_c$ pour que ce champ évanescent existe). En considérant que le faisceau incident est polarisé avec un angle α par rapport au plan d'incidence, on obtient les composantes suivantes pour le champ électrique évanescent \vec{E}_{t0} :

$$E_{t0x} = \frac{2 \cos(\theta_i) n_i \times \sqrt{n_i^2 \sin^2(\theta_i) - n_t^2}}{\sqrt{n_i^4 \cos^2(\theta_i) + n_i^4 \sin^2(\theta_i) - n_t^2 n_i^2}} \times \cos(\alpha) \times \exp\left[-i \left(\arctan\left(\frac{\sqrt{n_i^4 \sin^2(\theta_i) - n_t^2 n_i^2}}{n_t^2 \cos(\theta_i)}\right) + \frac{\pi}{2} \right)\right]$$

$$E_{t0y} = \frac{2 \cos(\theta_i) n_i}{\sqrt{n_i^2 - n_t^2}} \times \sin(\alpha) \times \exp\left[-i \left(\arctan\left(\frac{\sqrt{n_i^2 \sin^2(\theta_i) - n_t^2}}{n_i \cos(\theta_i)}\right) \right)\right]$$

$$E_{t0z} = \frac{2 n_i^2 \cos(\theta_i) \sin(\theta_i)}{\sqrt{n_i^4 \cos^2(\theta_i) + n_i^4 \sin^2(\theta_i) - n_t^2 n_i^2}} \times \cos(\alpha) \times \exp\left[-i \left(\arctan\left(\frac{\sqrt{n_i^4 \sin^2(\theta_i) - n_t^2 n_i^2}}{n_t^2 \cos(\theta_i)}\right) \right)\right]$$

[Abney 1992], [Jozefowski 2007].

Nous pouvons remarquer que ces composantes possèdent un facteur exponentiel complexe. Les

$$\text{deux termes de phase } \delta_{//} = \arctan\left(\frac{\sqrt{n_i^4 \sin^2(\theta_i) - n_t^2 n_i^2}}{n_t^2 \cos(\theta_i)}\right) \text{ et } \delta_{\perp} = \arctan\left(\frac{\sqrt{n_i^2 \sin^2(\theta_i) - n_t^2}}{n_i \cos(\theta_i)}\right),$$

qui dépendent de l'angle d'incidence θ_i , donnent accès aux décalages longitudinal et transverse du faisceau réfléchi par rapport au faisceau incident. Ces deux décalages sont respectivement connus sous les nom de décalage de Goos-Hanchen et décalage de Imbert [Imbert 1972], [Beauregard 1972].

L'expression des composantes du champ électrique nous permet également de mettre en évidence les propriétés particulières de la polarisation du champ évanescent :

- lorsque le champ électrique incident est perpendiculaire au plan d'incidence (ou autrement dit $\alpha = \pi/2$), les deux composantes E_{tx} et E_{tz} du champ évanescent sont nulles. Ainsi dans ce cas, et uniquement dans ce cas, le champ électrique évanescent est transverse à la direction de propagation, c'est-à-dire perpendiculaire au plan d'incidence.

- lorsque le champ électrique incident est dans le plan d'incidence (ou autrement dit $\alpha = 0$), le champ électrique évanescent a des composantes non nulles suivant les directions x et z qui sont respectivement parallèle et perpendiculaire à la direction de propagation. Le champ électrique évanescent reste dans ce cas dans le plan d'incidence. La polarisation de l'onde évanescente sera donc elliptique. Avec une telle polarisation incidente, il est possible d'avoir une onde évanescente polarisée de manière prédominante perpendiculairement à l'interface (et même polarisée complètement perpendiculairement à l'interface pour un angle d'incidence égale à l'angle critique). Une telle particularité trouve un certain nombre d'applications, comme par exemple pour la visualisation de l'orientation des membranes cellulaires [Sund 1999].

Dans ces deux cas particuliers, l'intensité relative du champ évanescent par rapport à celle du champ incident est facilement accessible à partir des composantes du champ électrique évanescent \vec{E}_{t0} . Dans le premier cas, avec un champ électrique incident perpendiculaire au plan d'incidence, l'intensité relative est donnée par :

$$I_{r,\perp} = \left| E_{t0x} \left(\alpha = \frac{\pi}{2} \right) \right|^2 + \left| E_{t0z} \left(\alpha = \frac{\pi}{2} \right) \right|^2 = \frac{4 \cos^2(\theta_i) (2n_i^4 \sin^2(\theta_i) - n_t^2 n_i^2)}{n_i^4 \cos^2(\theta_i) + n_i^4 \sin^2(\theta_i) - n_t^2 n_i^2}$$

Dans le second cas, avec un champ électrique incident parallèle au plan d'incidence, on obtient :

$$I_{r,\parallel} = \left| E_{t0y}(\alpha = 0) \right|^2 = \frac{4n_i^2 \cos^2(\theta_i)}{n_i^2 - n_t^2}$$

Le tracé de ces grandeurs en fonction de l'angle d'incidence révèle une augmentation d'un facteur 4 à 5 relativement à l'intensité incidente près de l'angle critique (figure 3-2). Ceci peut s'interpréter en terme d'interférences entre les faisceaux incidents et réfléchis.

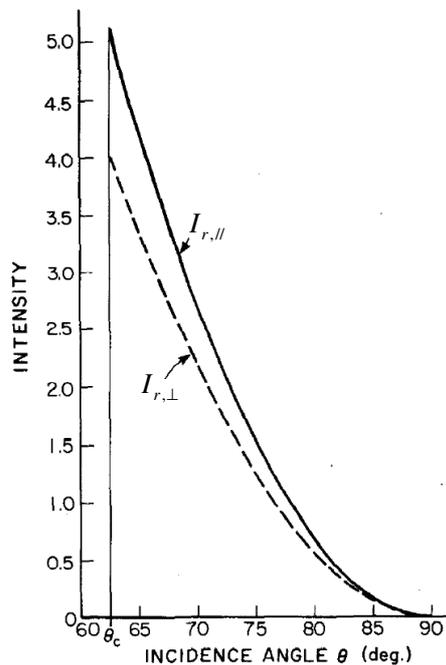


Figure 3-2: Intensités relatives à l'interface ($z = 0$) en fonction de l'angle d'incidence pour $n_i=1,50$ et $n_t=1,33$, correspondant à un angle critique de $62,46^\circ$ [Axelrod 1984].

Il est aussi important de souligner que la profondeur de pénétration du champ évanescent calculée précédemment ne dépend nullement de la polarisation.

En présence d'une couche intermédiaire entre le milieu incident d'indice n_i et le milieu d'indice n_t , il est possible de modifier les propriétés du champ évanescent. En particulier le dépôt d'un film métallique est très intéressant. Sous certaines conditions, il est possible d'exciter des électrons libres situés à la surface du film métallique et de provoquer une oscillation de ces particules, autrement appelée plasmon de surface [Axelrod 2001], [Economou 1969], [Barnes 2003].

Suivant la polarisation de l'onde incidente, le champ résultant est différent. Pour une onde évanescente polarisée dans le plan d'incidence (polarisation p), quand sa vitesse de phase est en accord avec celle du plasmon de surface, il va y avoir un phénomène de résonance qui va se traduire par une augmentation de l'intensité de l'onde évanescente polarisée dans le plan d'incidence. Concernant la polarisation perpendiculaire au plan d'incidence, un tel film réduit grandement, voire annule, l'intensité du champ évanescent polarisé dans cette direction (perpendiculaire au plan d'incidence), ceci quel que soit le champ incident. Ainsi au final, l'onde évanescente est polarisée linéairement dans le plan d'incidence, et ce quelle que soit la polarisation incidente.

La condition d'accord de phase entre le champ évanescent et le plasmon de surface, est réalisée pour un certain angle d'incidence, qui dépend de la constante diélectrique du métal (figure 3-3) [Kou 1988]. Une telle augmentation de l'intensité est d'autant plus remarquable qu'une couche de métal de 20 nm paraît opaque à l'œil.

Ce phénomène de résonance plasmon trouve de nombreuses applications notamment dans des biocapteurs [Maillart 2004], [Byun 2007], ou en microscopie [He 2006].

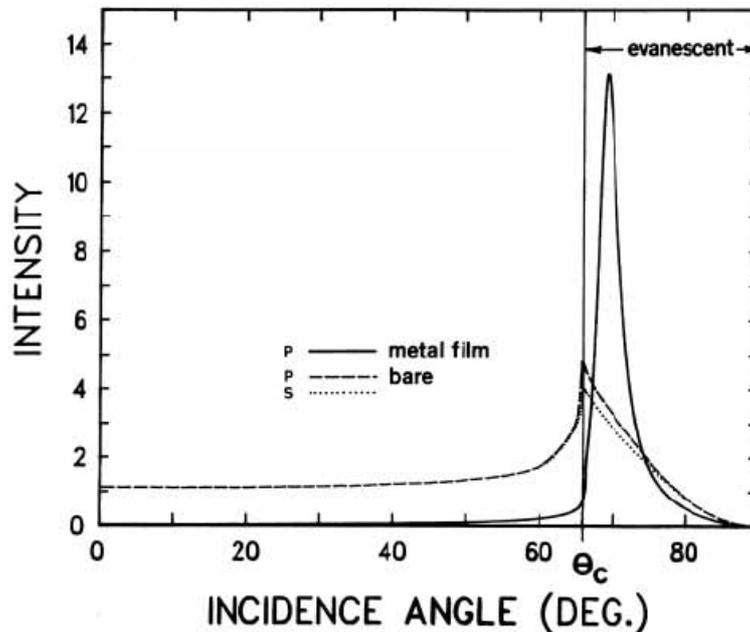


Figure 3-3 : Intensités évanescentes relatives suivant les polarisations s et p juste à l'interface ($z = 0$) en considérant une intensité incidente dans le verre égale à l'unité. Pour cette simulation, $n_i=1,46$ et $n_t=1,33$, correspondant à un angle critique de $65,7^\circ$. Le film métallique est ici une couche d'aluminium de 20 nm [Axelrod 2001].

Etant donné que nous ne travaillons que sur des substrats en verre sans couche métallique intermédiaire, nous ne reviendrons plus sur cette configuration dans ce manuscrit.

II - Utilisation en microscopie de fluorescence

Dans un contexte de recherche de l'amélioration de la résolution spatiale en microscopie, on conçoit aisément comment les propriétés physiques d'un tel champ évanescent peuvent profiter à des dispositifs d'imagerie. Dans le cas de la microscopie de fluorescence, les échantillons biologiques observés ont un indice de réfraction voisin de 1,38, et sont posés sur une lamelle de verre d'indice 1,5. Ainsi, à l'interface entre le verre et l'échantillon, la condition sur les indices est vérifiée pour permettre l'existence du phénomène de réflexion totale interne. Si l'angle d'incidence du faisceau est suffisant (c'est-à-dire supérieur à l'angle critique qui vaut dans ce cas environ 67°), la génération d'un champ exciteur évanescent est possible. Dès lors, la localisation de l'intensité lumineuse près de l'interface permet un confinement spatial de l'excitation, et confère à un tel dispositif d'imagerie une résolution axiale égale à la profondeur de pénétration du champ évanescent. Tout l'intérêt de cette technique est que la résolution axiale sub-longueur d'onde est obtenue uniquement à l'excitation et en champ large.

Un tel dispositif de microscopie de fluorescence, où l'excitation de l'échantillon est réalisée grâce au champ évanescent consécutif au phénomène de réflexion totale interne entre la lamelle et l'échantillon, est appelé TIRFM (pour Total Internal Reflection Fluorescence Microscopy) [Oheim 2005], [Toomre 2001]. Les mesures avec cette technique bénéficient d'un très faible bruit de fond, puisque les fluorophores situés plus profondément dans l'échantillon ne sont pas excités. De plus cette excitation assure une exposition minimale à la lumière des plans de l'échantillon loin de l'interface, ce qui réduit les photodommages et le photoblanchiment. La microscopie TIRF permet également de travailler en plein champ, ce qui permet d'obtenir des images sans avoir à « balayer » l'échantillon, sans reconstruction d'image.

II.1 – Confinement de l'excitation et modification de l'émission à proximité de l'interface

Cependant, l'interprétation quantitative du TIRF nécessite de prendre des précautions. En effet, la profondeur de pénétration est facilement calculable théoriquement, mais un certain nombre de paramètres difficilement appréciables influe expérimentalement sur cette grandeur. C'est le cas du profil spatial (divergence) et spectral (monochromaticité) du faisceau exciteur, de la qualité de l'interface (rugosité, pureté, inhomogénéités), et des propriétés optiques de l'échantillon (inhomogénéité d'indices sur de courtes distances subcellulaires, avec des variations de 1,32 à 1,38). Ces changements d'indices dans l'échantillon vont provoquer la diffusion (voire la réflexion) du champ évanescent aux interfaces. Ainsi le confinement du champ exciteur est graduellement perdu dans la direction de propagation, et la fluorescence générée par l'échantillon devient la superposition des fluorescences excitées respectivement par le champ évanescent et par la lumière diffusée (figure 3-4).

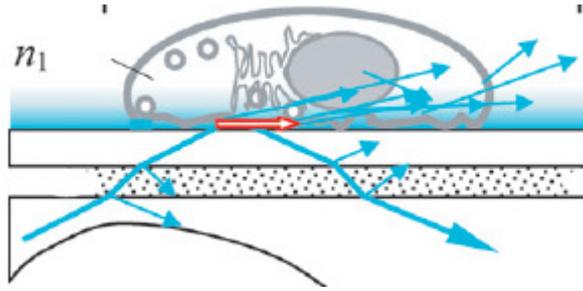


Figure 3-4 : schéma illustrant la perte du confinement du champ évanescent au cours de la propagation. Ici, cette perte est due aux inhomogénéités de l'échantillon. [Oheim 2005]

De plus, il faut bien garder à l'esprit que la proximité d'une interface, qu'elle soit diélectrique ou métallique, modifie l'émission du fluorophore. Sans rentrer dans les calculs, nous allons tenter de rapporter ici les notions essentielles, pour appréhender l'influence de la proximité de l'interface sur les intensités et les temps de vie de fluorescence mesurés. Les résultats rapportés ici sont basés sur un modèle utilisant l'émission d'un « dipôle à puissance fixée » [Hellen 1987].

Si on étudie la répartition radiale de l'intensité émise par le dipôle suivant son orientation (figure 3-5), on observe une forte anisotropie de l'émission. Il est intéressant de constater que, dans le cas d'un substrat en verre, la plus grande partie de l'intensité est émise dans le verre. Aussi, à condition de réussir à collecter les angles correspondant aux « pics », c'est-à-dire d'avoir des objectifs avec des ouvertures numériques assez grandes (supérieures à 1,4), la détection de la fluorescence dans le substrat est même meilleure.

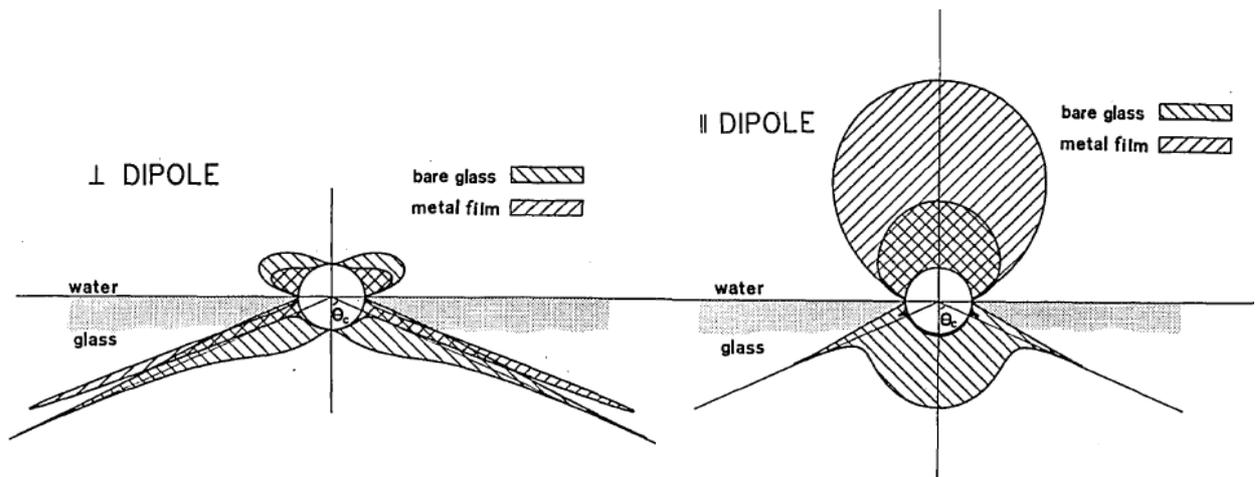


Figure 3-5 : intensité moyenne normalisée en fonction de l'angle d'observation polaire avec un dipôle situé à 80 nm de l'interface. Deux orientations sont présentées : perpendiculaire (à gauche) et parallèle (à droite) à l'interface. Dans chaque cas la répartition d'intensité est représentée avec ou sans une couche d'aluminium de 22 nm déposée sur le verre. [Hellen 1987].

La proximité de l'interface influe également sur le temps de vie de fluorescence du fluorophore. Pour voir cela, il est nécessaire d'introduire les notations suivantes :

$$p \equiv \frac{P_T(z)}{P_T(z = \infty)}$$

avec $P_T(z)$ la puissance totale dissipée par le dipôle (rayonnement plus chaleur) à amplitude fixée à une distance z de l'interface et :

$$f \equiv \frac{\int_{4\pi} d\Omega S(\Omega', \Omega, z)}{\int_{4\pi} d\Omega S(\Omega', \Omega, z = \infty)}$$

où S est l'intensité rayonnée à amplitude fixée, Ω l'angle solide d'observation, Ω' l'angle solide d'excitation. Ces deux quotients représentent respectivement le rapport entre la puissance totale dissipée par un dipôle à une altitude z et le même dipôle à l'infini, et le rapport entre la puissance rayonnée par un dipôle à une altitude z et le même dipôle à l'infini. Notons que ces deux quotients sont fonctions de z , mais aussi de l'orientation du dipôle.

Si on note q l'efficacité quantique du fluorophore (dépendant de l'orientation du dipôle) à une distance z , et q_0 l'efficacité quantique du même dipôle isolé, on peut montrer que :

$$\frac{1}{q} = \frac{\left(\frac{1}{q_0} + p - 1\right)}{f}$$

En considérant un fluorophore avec un temps de vie τ_0 en l'absence de désexcitation non radiative, on montre que le temps de vie de fluorescence du même fluorophore près de l'interface est :

$$\tau = \frac{q\tau_0}{f}$$

Dans la plupart des cas, et notamment avec des interfaces en verre, la proximité de l'interface se traduit de deux manières. D'une part, en interagissant avec la surface, le champ proche du dipôle va provoquer une augmentation du champ rayonné dans le milieu le plus dense (i.e. le verre). D'autre part, la surface peut dissiper l'énergie en chaleur. Ainsi pour des distances à l'interface d'une dizaine de nm, ces deux effets se combinent pour augmenter la puissance totale dissipée P_T et donc diminuer le temps de vie de fluorescence de l'ordre de 10 %. Ainsi, si expérimentalement nous observons des diminutions de temps de vie de fluorescence en TIRF, il faudra garder à l'esprit que la proximité de l'interface peut en être responsable.

II.2 - Applications

Intrinsèquement, cette technique ne permet d'observer que les premières centaines de nanomètres de l'échantillon près de l'interface, ce qui exclut toute imagerie en profondeur (figure 3-6). Mais le très bon rapport signal à bruit et la résolution axiale sublongueur d'onde obtenue simplement font de cette technique de microscopie une méthode complémentaire aux autres méthodes de microscopie [Axelrod 2001], [Mashanov 2003].

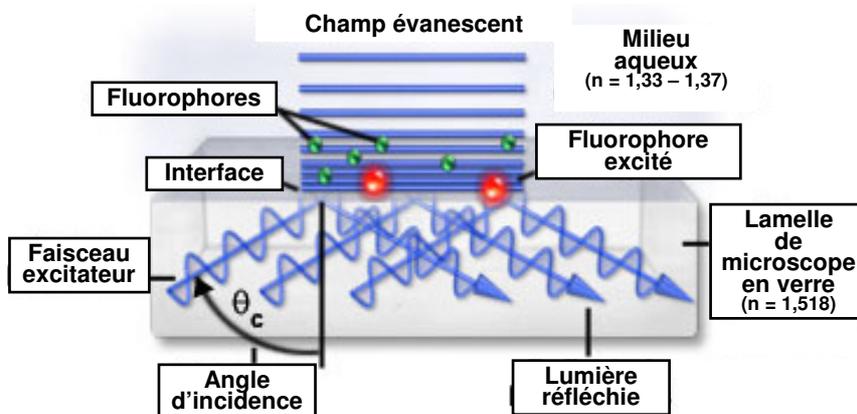


Figure 3-6 : schéma de principe de la microscopie TIRF d'après [Nikon 2008].

Nous allons rapporter ici un certain nombre d'applications biomédicales de la microscopie TIRF. Cette technique d'imagerie autorise une visualisation sélective des régions de contact cellules-substrats. Elle permet d'observer qualitativement la position, l'extension, la composition ou encore le mouvement des régions de contact. Il est ainsi possible de mettre en évidence l'influence des composantes d'une surface biomatérielle [Burmeister 1998] ou des protéines d'adhésion [Delanoë-Ayari 2004] lors de ces contacts cellules-substrats. Des travaux rapportent l'étude du contact entre des cellules leucémiques de rat et des cibles de membrane lipidique déposées sur une lamelle [Weis 1982], ou du rôle de l'actine et des granules de sécrétion quand la cellule adhère au verre [Lang 2000].

Il est également possible de visualiser des molécules uniques près de la surface et de réaliser des mesures spectroscopiques sur ces entités. Le but est ici de pouvoir observer les propriétés de molécules individuelles sans le moyennage d'ensemble inhérent aux spectroscopies standards dans les milieux massifs. Ainsi des détections de molécules uniques dans des volumes de quelques attolitres sont possibles [Ruckstuhl 2004]. On peut ainsi par exemple observer le mouvement de molécules uniques dans des gels [Dickson 1996]. Il est également possible de suivre des interactions de molécules uniques avec des microtubules [Vale 1996] ou des bactéries [Khan 2000]. Un autre domaine d'application de la microscopie TIRF est la mesure des vitesses de fixation des protéines extra- et intracellulaires aux récepteurs de surface de cellules ou à des membranes artificielles. Pour cela, il a été démontré assez tôt l'utilité de l'association de la microscopie TIRF à la spectroscopie de corrélation de fluorescence (FCS) et à la mesure du recouvrement de fluorescence après photoblanchiment (FRAP) [Thompson 1981], notamment avec la réalisation de premières mesures relatives à l'adsorption de l'immunoglobuline [Thompson 1983]. Plus récemment l'association TIRF-FCS a permis d'observer des réactions de surface et de diffusion à une interface liquide solide [Starr 2001], [Leutenegger 2006], ou de mesurer la diffusion latérale d'une protéine fluorescente en intracellulaire dans la membrane plasmique [Ohsugi 2006]. Grâce au couplage avec des expériences de FRAP, l'influence de certaines protéines dans l'activité de canaux ioniques a également pu être mise en évidence [Pochynyuk 2007].

On peut en outre utiliser le déclin exponentiel du champ évanescent pour suivre les granules de sécrétion dans des cellules, avant et pendant le processus de sécrétion. En effet, des petits déplacements nanométriques de ces granules perpendiculairement à l'interface vont se traduire par des variations d'intensité mesurables [Oheim 1998], [Steyer 1999], [Allersma 2006].

La microscopie TIRF est aussi employée pour appréhender les structures micromorphologiques et dynamiques des cellules vivantes. Par exemple, les propriétés de polarisation du champ évanescent sont utilisées pour étudier l'orientation de la membrane [Sund 1999]. La microscopie TIRF permet également d'observer en temps réel des processus comme la polymérisation de filament d'actine [Kuhn 2005], ou encore d'étudier les irrégularités submicrométriques comme les sites d'exocytose et voir le rôle du calcium dans la régulation de ce processus [Becherer 2003].

Enfin, la très faible proportion de la cellule exposée au rayonnement en microscopie TIRF permet de faire des acquisitions à long terme, notamment pendant le développement de la cellule en culture sans l'altérer. Ainsi des acquisitions sur plusieurs jours, voire plusieurs semaines ont été rapportées [Wang 1994].

II.3 - Géométries

Expérimentalement, l'excitation d'un échantillon par un champ évanescent peut être réalisée grâce à différentes géométries de réflexion totale interne. Cette dernière peut être obtenue avec

des systèmes basés sur l'utilisation soit d'un (ou plusieurs) prisme(s), soit d'un objectif à grande ouverture numérique. [Axelrod 2001], [Conibear 2000], [Schneckenburger 2005], [Stout 1989].

II.3.1 - Configurations avec prisme

Historiquement, le premier dispositif de microscopie de fluorescence cellulaire en réflexion totale interne rapporté par Axelrod en 1981 utilise un prisme de forme cubique [Axelrod 1981] (figure 3-7). Axelrod proposa d'appliquer cette méthode d'illumination à la microscopie cellulaire en s'inspirant des travaux d'Ambrose, qui introduisit cette technique d'illumination [Ambrose 1961], et de travaux en spectroscopie de fluorescence pour l'observation de monocouches [Harrick 1973].

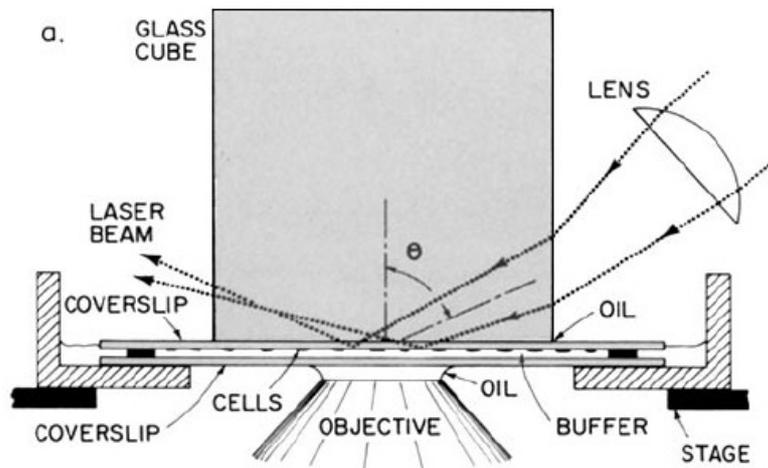


Figure 3-7 : premier dispositif de microscopie cellulaire TIRF proposé par Axelrod [Axelrod 1981].

Le principe est le suivant : la réfraction dans le prisme, dont l'indice de réfraction est plus élevé que celui du milieu incident (de l'air) va rapprocher le faisceau excitateur de la normale au plan d'incidence et par conséquent l'incliner d'avantage par rapport à la lamelle. Ainsi, à l'interface entre la lamelle et l'échantillon, des angles supérieurs à l'angle critique peuvent être atteints assez simplement, sans avoir besoin d'illuminer le montage avec des incidences rasantes.

Dans la configuration historique précitée, le prisme est positionné sur l'axe optique. La même géométrie peut être adoptée mais avec des prismes équilatéraux, trapézoïdaux ou hémisphériques (figure 3-8).

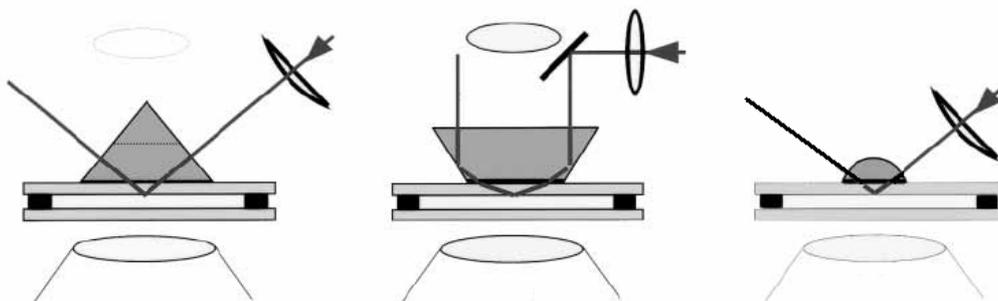


Figure 3-8 : différentes géométries de réflexion totale interne avec un prisme positionné sur l'axe optique d'après [Axelrod 2001]. De gauche à droite, sont utilisés un prisme équilatéral, un prisme trapézoïdal et un prisme hémisphérique.

L'utilisation de ces géométries oblige à réaliser la détection du signal de fluorescence avec l'objectif de microscope de l'autre côté de l'échantillon. De plus, la présence du prisme restreint le mouvement de la platine où se trouve l'échantillon. Avec des microscopes inversés, l'échantillon doit être monté entre deux lamelles, et coincé entre le prisme d'un côté et l'objectif de l'autre, ce qui réduit l'accessibilité au spécimen observé. Le choix de l'objectif est aussi primordial : l'utilisation des objectifs à immersion à huile permet une collection de la fluorescence plus efficace, mais le contraste va être altéré pour des échantillons épais. En effet, comme le signal traverse l'échantillon avant d'être détecté, des aberrations sont introduites. Pour des épaisseurs d'échantillons comprises entre 30 μm et 100 μm , il vaut mieux travailler avec des objectifs à immersion à eau. Pour avoir les meilleures images avec cette géométrie, il faut utiliser un microscope droit et un objectif à immersion à eau directement submergé dans la « chambre » contenant l'échantillon (figure 3-9). Pour les échantillons trop épais ou trop diffusants, la détection ne peut pas se faire du côté opposé à l'excitation.

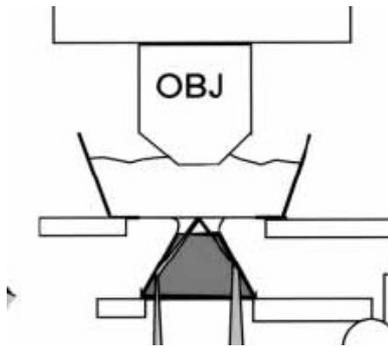


Figure 3-9 : utilisation d'un microscope droit et d'un objectif à immersion à eau. Une géométrie avec un prisme trapézoïdale est réalisée [Axelrod 2001].

Il faut également choisir précautionneusement le prisme et la lamelle (ou la lame) où se produit la réflexion totale : ces deux éléments doivent avoir exactement le même indice et le couplage optique doit être de bonne qualité (utilisation de glycérol, de cyclohexanol ou d'huile).

Dans ces configurations, une lentille est utilisée pour focaliser le faisceau excitateur sur l'échantillon, avec une étendue spatiale de l'ordre du champ de vue pour limiter la diffusion de l'excitation et la fluorescence parasite des éléments du montage (huile, lamelle, prisme). La largeur angulaire doit être également assez faible pour pouvoir sélectionner proprement l'angle d'incidence et donc la profondeur de pénétration du champ évanescent.

L'utilisation d'une géométrie avec prisme présente des avantages certains. C'est avec cette technique que l'on obtient les champs évanescents les plus homogènes. De plus, l'angle d'incidence est facilement ajustable, et peut prendre toutes les valeurs de 0 à 90°, ce qui assure une maîtrise de la profondeur de pénétration du champ évanescent. D'ailleurs cette configuration est utilisée pour détecter sélectivement les fluorophores selon la profondeur et faire de la topographie [Schneckenburger 2005].

Certaines géométries alternatives ont été développées toujours avec des prismes, mais en utilisant la lame (ou la lamelle) comme guide d'ondes pour exploiter de multiples réflexions (figure 3-10). Avec ces géométries, la troisième ou quatrième réflexion est utilisée pour illuminer l'échantillon. La présence d'un deuxième prisme de « sortie » est indispensable pour que la lumière ne soit pas piégée dans le guide ni diffusée sur la face de fin de la lame(lle). Ainsi, en déportant le prisme, il est possible d'exciter l'échantillon et de détecter la fluorescence du même côté, libérant l'accès à l'échantillon. Le couplage de l'excitation est assez critique, et encore plus dans la configuration où excitation et détection se font du même côté (puisque dans ce cas-là, il faut guider l'excitation dans une lamelle et non plus dans une lame).

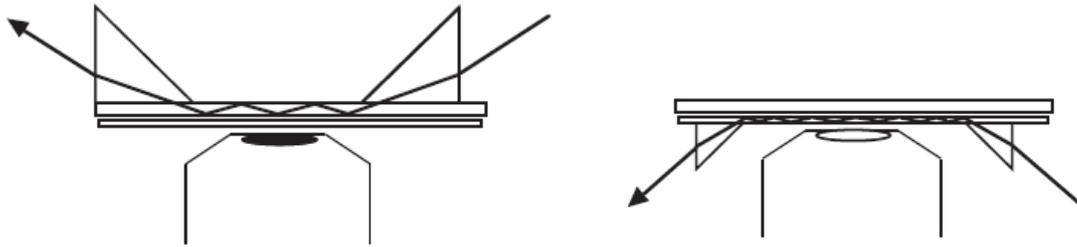


Figure 3-10 : deux configurations avec des prismes hors d'axe. A gauche, excitation et détection sont réalisées sur les faces opposées de l'échantillon, alors qu'à droite tout se fait du même côté [Conibear 2000].

D'autres équipes ont quant à elles travaillé sur des géométries de prismes particulières pour optimiser l'excitation et ne privilégier aucune direction [Wakelin 2002].

II.3.2 - Configurations sans prisme avec un objectif à grande ouverture numérique

Ces géométries sont quant à elles basées sur l'utilisation d'objectifs de microscope avec des ouvertures numériques (ON) élevées. En effet, on pourra se placer dans des conditions de réflexion totale interne uniquement si l'ouverture numérique de l'objectif est supérieure à l'indice de réfraction du milieu observé. En notant θ_m l'angle maximum avec lequel le faisceau émerge dans l'huile, nous avons :

$$ON = n_{\text{huile}} \sin(\theta_m)$$

Comme l'égalité de Snell-Descartes est vérifiée au cours des différentes réfractions à chaque interface plane, nous obtenons :

$$ON = n_i \sin(\theta_{i,m})$$

où n_i est l'indice de la lamelle (avec toujours les notations définies au début de ce chapitre) et $\theta_{i,m}$ est l'angle d'incidence à l'interface lamelle échantillon maximal atteignable avec l'ouverture numérique de l'objectif. Pour pouvoir être en réflexion totale, il faut que cet angle $\theta_{i,m}$ soit plus grand que l'angle critique, ou autrement dit :

$$\sin(\theta_{i,m}) > \sin(\theta_c)$$

$$n_i \sin(\theta_{i,m}) > n_i \times \frac{n_t}{n_i}$$

$$ON > n_t$$

L'indice de réfraction d'un échantillon biologique étant voisin de 1,38, des objectifs avec des ouvertures numériques supérieures ou égales à 1,4 peuvent être utilisés. De tels objectifs sont maintenant disponibles commercialement, et ont permis de remettre au goût du jour la microscopie TIRF une vingtaine d'années après sa découverte. Toutes les grandes entreprises de microscopie proposent de tels objectifs avec des grossissements de 60x et des ouvertures numériques autour de 1,45 (Olympus 1,45 ; Leica 1,46 ; Nikon 1,49) qui utilisent des huiles et des lamelles « traditionnelles ». D'autres objectifs avec des grossissements de 100x et des ouvertures numériques encore plus grandes (Olympus 1,65) existent aussi, mais ces derniers nécessitent des huiles d'indice 1,78, très volatiles (qui laissent en plus des résidus cristallins) et toxiques, ainsi que des lamelles en verres particuliers (SF11 ou LAFN21) beaucoup plus onéreuses et avec une forte dispersion chromatique.

Dans cette géométrie avec des objectifs à forte ouverture numérique, pour qu'un phénomène de réflexion totale à l'interface lamelle échantillon se produise, il faut un angle d'incidence élevé à l'interface lamelle-échantillon, ce qui signifie que le faisceau excitateur doit couvrir une zone périphérique de la pupille de l'objectif. Pratiquement, cette configuration est réalisée d'une manière simple en focalisant le faisceau excitateur dans le plan focal arrière de l'objectif (figure 3-11). Ainsi, la position hors d'axe où ce faisceau est focalisé, ou plus précisément la distance entre le point de focalisation et l'axe optique est directement liée à l'angle incident entre la lamelle et l'échantillon. Pour des positions trop proches de l'axe optique, il n'y a pas de phénomènes de réflexion totale, et l'échantillon est éclairé dans une configuration d'épifluorescence classique. Quand le point de focalisation est situé à la distance qui correspondrait à une ouverture numérique égale à l'indice de réfraction du milieu d'observation, on passe en réflexion totale interne, et le champ évanescent est excité. Ensuite, en augmentant encore la distance à l'axe optique, on va réduire la profondeur de pénétration du champ évanescent (figure 3-11). En opérant ainsi, une telle configuration permet de changer continûment l'angle d'incidence de la position d'épifluorescence jusqu'au TIRF, uniquement en déplaçant dans le plan focal arrière de l'objectif le point de focalisation du centre vers la périphérie de la pupille d'entrée. Ceci peut être réalisé de différentes manières, par exemple en déplaçant la lentille de focalisation ou en augmentant l'angle d'incidence sur cette lentille.

La taille de la zone d'excitation augmente avec la convergence des rayons dans le plan focal arrière de l'objectif. Expérimentalement, cette augmentation est réalisée en étendant le faisceau sur la lentille qui permet de focaliser dans le plan focal arrière de l'objectif.

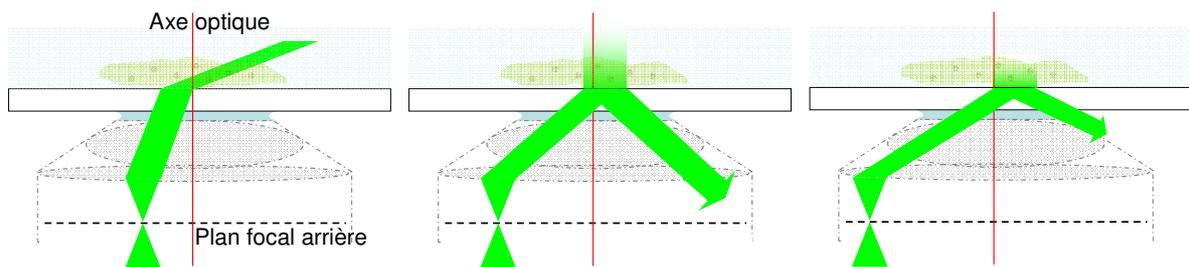


Figure 3-11 : schéma illustrant l'influence de la position du point de focalisation dans le plan focal arrière de l'objectif.

Plus la focalisation dans le plan focal arrière de l'objectif est de bonne qualité, autrement dit plus la tâche de focalisation est petite, plus le nombre d'angles émergent de l'objectif est faible, et mieux la profondeur de pénétration du champ évanescent est maîtrisée. Dans le cas idéal, pour une tâche ponctuelle dans le plan focal arrière, on a un unique angle émergent et donc une unique profondeur de pénétration du champ évanescent.

Cependant, le champ évanescent créé avec cette géométrie souffre d'un certain nombre d'inhomogénéités. Tout d'abord, il n'est pas rare d'avoir des problèmes de réflexion du faisceau à l'intérieur de l'objectif, ce qui peut être causé par l'écrêtage du faisceau par l'objectif lorsque la focalisation dans le plan focal arrière est importante. Ainsi certains rayons préalablement déviés par des réflexions parasites vont arriver à l'interface lamelle-échantillon avec un angle inférieur à l'angle critique, créant des irrégularités du fond lors de l'observation. De plus, lorsque l'on travaille avec une source d'excitation cohérente comme le laser, ces réflexions, ainsi que les poussières sur les éléments du trajet optique vont créer des phénomènes d'interférences ou de diffraction qui vont dégrader le champ excitateur au niveau de l'échantillon.

On constate également que l'asymétrie de l'excitation (on focalise dans le plan focal arrière en un point) va définir une unique direction de propagation du champ évanescent (figure 3-12). Par conséquent, dans cette direction, à cause des inhomogénéités de l'échantillon, le confinement spatial du champ évanescent va diminuer, et on observe un « bavement », une perte de contraste.

Pour remédier à ces problèmes d'inhomogénéité, plusieurs dispositifs ont été élaborés dernièrement en utilisant la même idée : faire décrire au point de focalisation dans le plan focal arrière de l'objectif un cercle centré autour de l'axe optique. En utilisant des temps d'acquisition assez longs devant cette période de rotation pour permettre un moyennage, des images de meilleure qualité avec un champ plus homogène sont obtenues [Mattheyses 2006], [Fiolka 2008].

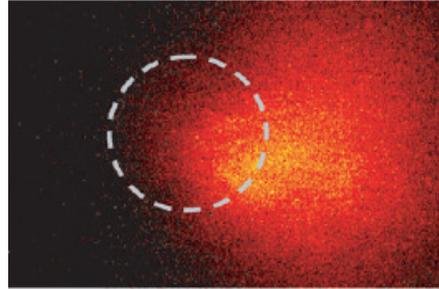


Figure 3-12 : asymétrie du champ évanescent. Le cercle central représente la pupille de sortie de l'objectif. Dans ce cas, la focalisation est réalisée à gauche dans l'objectif (en regardant l'échantillon et l'objectif par-dessus) [Oheim 2005].

Il est également possible avec ces géométries basées sur un objectif à forte ouverture numérique, de créer un plan équivalent au plan focal arrière de l'objectif et accessible, pour mettre en forme le faisceau. Ainsi la sélection des rayons périphériques hors d'axe se fait dans ce plan. On peut placer un disque opaque amovible qui bloque les rayons centraux, et ne laissent passer que les rayons périphériques « supercritiques » : ainsi en retirant le disque on passe de la configuration TIRF à la configuration épifluorescence traditionnelle. Cette technique peut être utilisée avec des lampes à arc, permettant à l'expérimentateur de s'affranchir des problèmes de cohérence de l'excitation. Cependant, la plupart de la puissance de la lampe est bloquée par le disque. On peut également utiliser une lentille conique associée à une lampe à arc, ou encore, lorsque l'on travaille avec un laser, casser la cohérence de l'excitation en passant à travers une suspension de billes de latex (figure 3-13).

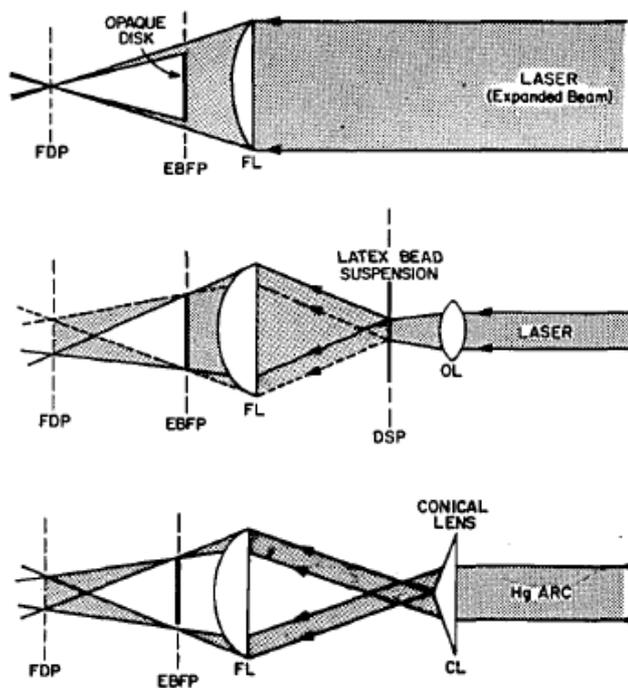


Figure 3-13 : mise en forme du faisceau dans un plan équivalent au plan focal arrière de l'objectif (EBFP). En haut, disque opaque qui ne laisse passer que les rayons « supercritiques » ; au centre utilisation d'une suspension de bille de latex pour casser la cohérence de l'illumination ainsi que d'un disque opaque ; en bas, utilisation d'une lampe à arc avec un axicon pour augmenter la puissance de lumière supercritique au détriment de la lumière subcritique. [Stout 1989].