Résumé

Développement d'un microscope SPR pour imagerie de phase par holographie numérique

Doctorant : Hongyu LI

L'objectif de ce travail est de concevoir et de réaliser un microscope de phase à résonance de plasmon de surface (Surface Plasmon Resonance Phase Microscope : SPRPM). Il combine un microscope holographique numérique (Digital Holography Microscope : DHM) et un dispositif d'excitation du plasmon de surface basé sur un objectif de microscope à grande ouverture numérique (ON). Le SPRPM observera et mesurera la réponse en phase des interactions plasmon-échantillon.

Le plasmon de surface est une oscillation collective d'électrons libres à l'interface entre un métal (matériau à permittivité négative) et un diélectrique (matériau à permittivité positive). Il peut entrer en résonance avec un champ électromagnétique externe comme la lumière et peut être considéré comme une onde qui se propage le long de l'interface. Le phénomène de résonance du plasmon de surface (Surface Plasmon Resonance : SPR) a été découvert et décrit par R.W. Wood en 1902. La méthode d'excitation lumineuse utilisant la réflexion totale atténuée (Attenuated Total Reflection : ATR) a été inventée par A. Otto en 1968. E. Kretschmann et H. Raether ont présenté leur dispositif basé sur l'ATR plus tard la même année. La configuration de Kretschmann-Raether (K-R), qui est composée d'une structure prisme-film métallique-diélectrique, est toujours la configuration la plus employée pour la détection par SPR.

L'imagerie SPR (Surface Plasmon Resonance imaging : SPRi) a été inventée en 1988. Il s'agit d'une méthode sans marquage qui est considérée comme un outil idéal pour observer des activités chimiques ou biologiques sur un substrat métallique. L'absence de marquage signifie que l'utilisation de fluorophores qui sont susceptibles de modifier des liaisons chimiques n'est pas nécessaire. Par ailleurs, la profondeur de pénétration de la SPR étant de plusieurs centaines de nanomètres, le bruit de fond est réduit. À la fin des années 1990, les techniques

d'imagerie de phase, notamment l'interférométrie, la polarimétrie et l'holographie, ont été combinées à l'imagerie SPR. Par rapport à la SPRi d'amplitude, plus couramment utilisée, l'imagerie de phase SPR (Surface Plasmon Resonance Phase imaging : SPRPi) présente une plus grande sensibilité et une meilleure stabilité en général. Parmi ces techniques de détection de phase, l'imagerie holographique permet un suivi en temps réel car une seule image est nécessaire pour la reconstruction de la phase.

En 2007, Huang *et al.* ont introduit une SPRi basée sur un objectif de microscope. Ils ont remplacé le prisme de couplage dans la configuration K-R par un objectif à grande ouverture numérique. Grâce à cette méthode, l'imagerie *in vivo* d'une cellule unique a été réalisée. Le premier microscope holographique SPR (Surface Plasmon Resonance Holographic Miscroscope : SPRHM) utilisant un objectif a été présenté en 2015, sur la base d'un interféromètre de Mach-Zehnder. Plus tard en 2017, J. Zhang *et al.* ont combiné un système holographique utilisant un prisme de Wollaston avec un microscope SPR. Récemment, des observations *in vivo* d'adhérence cellulaire et du processus inverse ont été faites avec le système de Zhang.

Le microscope holographique SPR conventionnel a l'avantage d'avoir une haute résolution et une haute sensibilité. Mais l'angle de résonance de la lumière visible nécessite des objectifs à ON extrêmement élevée. Pour une interface or-eau, l'ON doit être supérieure à 1,44 (en pratique, on utilise des ON de 1,49 ou 1,65). Ces objectifs sont onéreux et peu courants dans les laboratoires de biologie. Dans ce travail, une diode laser émettant dans le proche infrarouge (Near Infra Red : NIR) a été choisie comme source de lumière pour réduire l'angle de la SPR. Par conséquent, un objectif d'ON 1,40 plus accessible a pu être utilisé pour le SPRHM.

Le microscope holographique SPR a été construit avec une diode laser NIR à 850 nm, un objectif 60x d'ON 1,42 immergé dans l'huile et une unité d'imagerie holographique basée sur un prisme de Wollaston. La diode laser est polarisée, filtrée et focalisée sur le plan focal arrière (Back Focal Plane : BFP) de l'objectif

d’excitation. Une illumination collimatée est alors créée à l'interface métal-diélectrique. L'angle d'incidence est contrôlé par la position radiale du point focal sur le BFP. L'objectif sélectionné pour l'excitation du plasmon de surface offre une résolution beaucoup plus élevée que le prisme couramment utilisé. Les distorsions d’images induites par ce dernier sont également évitées. Le front d’onde réfléchi par l’échantillon est repris par une lentille à longue distance focale et dirigé sur le prisme de Wollaston, générant un hologramme hors axe à chemin commun. L'onde polarisée p qui transporte l'information SPR est l'onde objet. L'onde polarisée s, qui ne peut pas exciter le plasmon de surface, est directement réfléchie pour servir d'onde de référence. Ces deux ondes sont recombinées par un polariseur pour fournir l'hologramme hors axe. La réponse complexe de l’interaction plasmon-échantillon est restituée par des algorithmes de reconstruction holographique. Le suivi en temps réel du changement d'indice de réfraction à l'interface or-air a été expérimenté et la réponse imageante du microscope a été analysée avec des solutions aqueuses.

A. Publication dans des revues internationales avec comité de lecture

H. Li *et al.*, "Lensless inline digital holography versus Fourier ptychography: phase estimation of a large transparent bead," Opt. Eng. 59(8), 083104 (2020).

B. Conférence internationale avec actes

H. Li, A. Bozhok, Y. Takakura, P. Twardowski, and J. Zallat, “Phase estimation of large transparent objects with lensless inline digital holography and comparison with Fourier ptychography,” accepté pour presentation orale, SPIE Europe 2020 (retirée en raison du Covid-19).