Mémoire

Présenté pour obtenir le diplôme d'

HABILITATION À DIRIGER DES RECHERCHES DE L'UNIVERSITÉ GRENOBLE ALPES

Spécialité : Physique

Arrêté ministériel : 23 novembre 1988

Présenté par

Pierre BLANDIN

Docteur

préparé au sein du **Laboratoire d'Electronique et de Technologie de l'Information (LETI)**
dans **l'École Doctorale de Physique**

Contributions en instrumentation optique pour l'étude du vivant

HDR soutenue publiquement le **7 décembre 2021**,
devant le jury composé de :

Emmanuel BOSSY
Professeur Université Grenoble Alpes, Laboratoire Interdisciplinaire de Physique, Grenoble, Examinateur, Président du Jury
Sophie BRASSELET
Directeur de Recherche CNRS, Institut Fresnel, Marseille, Rapportrice
Olivier LIMOUSIN
Ingénieur-chercheur HDR, Département d'Astrophysique, DRF/Irfu, CEA-Saclay, Examinateur
Pierre NASSOY
Directeur de Recherche CNRS, Laboratoire de Photonique, Numérique et Nanosciences, Talence, Rapporteur
Gilles TESSIER
Professeur Sorbonne Université, Institut de la Vision, Paris, Rapporteur
Olivier UTEZA
Directeur de Recherche CNRS, Laboratoire Lasers Plasmas Procédés Photoniques, Marseille, Examinateur
Nathalie WESTBROOK
Professeur Université Paris Saclay, Laboratoire Charles Fabry de l'Institut d'Optique, Saclay, Examinateur

Contributions en instrumentation optique pour l'étude du vivant

Préambule

*„Versuche nicht, ein erfolgreicher, sondern ein wertvoller Mensch zu werden. "**
** « N'essayez pas de devenir un homme qui a du succès. Essayez de devenir un homme qui a de la valeur »*
Albert Einstein

Pourquoi vouloir passer son Habilitation à Diriger des Recherches, cette fameuse HDR ? Et avant tout, qu'est-ce que l'HDR ? Cette habilitation « sanctionne la reconnaissance du haut niveau scientifique du candidat, du caractère original de sa démarche dans un domaine de la science, de son aptitude à maîtriser une stratégie de recherche dans un domaine scientifique ou technologique suffisamment large et de sa capacité à encadrer de jeunes chercheurs » (texte de l'Arrêté du 23 novembre 1988). Chaque candidat peut mettre cette définition en perspective de son parcours et de ses aspirations.

L'HDR donne une reconnaissance du niveau scientifique, de la qualité du travail accompli, de la démarche suivie durant des années. Pour tenter d'obtenir cette reconnaissance, la première chose à faire est de dresser le bilan de ce qui a été réalisé. Il y a le bilan « comptable », basé sur le facteur H, le nombre de publications, de conférences, de brevets… Ce bilan est régulièrement exigé des chercheurs, permettant de quantifier « l'excellence ». Il est peut-être parfois nécessaire, dans tous les cas facile et rapide à faire, mais il est réducteur quant à la profondeur et aux motivations essentielles du travail accompli. Il y a le bilan « scientifique », plus complet, qui permet de mettre en évidence les compétences acquises, les connaissances accumulées à travers l'ensemble des travaux menés. Ce bilan plus qualitatif me semble un meilleur indicateur de la qualité « scientifique » d'un chercheur. Enfin, l'HDR est pour moi l'occasion de faire également un bilan plus introspectif : au fil de ce début de carrière, j'ai fait des choix, j'ai pris des orientations, j'ai saisi des opportunités qui se présentaient. Il y a toujours eu des valeurs, des sensibilités, des rencontres, des envies, des compétences, pour m'orienter, et c'est ce fil directeur que j'interroge en faisant ce bilan. Treize ans après ma thèse, j'ai ressenti le besoin de faire ce point d'étape, et également de m'interroger sur la suite. Fort de mes expériences, je peux mieux définir le cadre de travail qui me convient le mieux, la meilleure manière d'aborder les problématiques scientifiques, et les thématiques qui me semblent en meilleure adéquation avec l'environnement de travail (actuellement le CEA/LETI) et mes compétences.
Mon parcours, pas parfaitement rectiligne, m'a permis de travailler dans des environnements différents (le CNRS, l'Université d'Aix Marseille, la direction de la recherche technologique du CEA). Cela m'a forgé une expérience particulière, et m'a permis d'appréhender la Recherche avec une vision assez large, allant de la recherche fondamentale académique, à la recherche technologique couplée au développement en partenariat avec des industriels. Mon fil directeur a

été avant tout scientifique et technique, et on le retrouve dans le titre du manuscrit : l'instrumentation optique pour l'étude du vivant. J'ai été guidé par l'envie perpétuelle d'apprendre de nouvelles choses dans ce domaine si vaste, de découvrir de nouveaux horizons, et de partager ces connaissances.

L'HDR donne une reconnaissance de la capacité à encadrer de jeunes chercheurs. L'encadrement est un pilier fondamental de mon travail de chercheur, et fait partie de nos missions. J'ai eu la chance, depuis mon stage de fin d'étude, de travailler avec quelques excellents scientifiques, animés d'une soif d'apprendre et d'une envie de transmettre. Ces collègues m'ont beaucoup apporté et m'ont permis de me construire en tant que scientifique. Ils ont dirigé mes travaux de recherche en me laissant toujours une part d'initiative, en accord avec mes compétences et mon expérience du moment. En suivant ces exemples, à mon tour, j'essaie d'apporter ma contribution à la Recherche en formant les futures générations de chercheurs. Encadrer c'est diriger, orienter, mais sans contraindre à suivre pas à pas le chemin qu'on aurait tracé. Il faut aider ces jeunes à développer leur créativité, leur force de proposition, leur initiative tout en leur inculquant les bases du travail de chercheur et en leur transmettant notre savoir.
L'encadrement repose sur une relation humaine, qui est un vrai échange : je suis à chaque fois surpris de la quantité de choses que j'apprends au contact de jeunes stagiaires, thésards ou postdocs. Par nature, leurs compétences et leur expérience en recherche sont moindres. Mais avec des formations différentes de celle que j'ai suivie, des intérêts autres, un regard neuf sur le sujet, il arrive que nous soyons amenés à ouvrir ensemble des portes que, seul, je n'avais même pas aperçues, et que nous progressions ensemble sur certaines voies. Au fil du temps, surtout pour les doctorants, la relation évolue : d'une relation de « maître à élève » on se dirige vers une relation entre collègues. C'est d'ailleurs pour moi un indicateur d'un encadrement de thèse réussi : quand on a participé à la transformation d'un jeune étudiant en collègue chercheur, avec qui nous pouvons mener des confrontations d'idées qui font avancer scientifiquement. Pour ma part je conçois un travail de recherche comme une réalisation collective, avec des idées qui s'affrontent pour mieux s'enrichir, des différences de point de vue qui se partagent pour ensemble évoluer dans la meilleure direction, et ce binôme encadrant – encadré est le début, la base de ce travail collectif.
Ces encadrements permettent également d'évoluer dans la façon dont on imagine et dont on construit une stratégie de recherche. Cela impose de faire preuve d'adaptabilité et de réactivité. Cela permet d'apprendre à bien cerner et définir les priorités. Et cela apprend également à co-construire des objectifs, par des échanges et de la confrontation scientifique, une fois encore sans les imposer pour que le jeune chercheur cerne bien le sens et s'approprie parfaitement ses travaux.

L'encadrement permet également de transmettre des valeurs, une éthique, et un esprit critique avant tout envers son travail, mais également envers celui des autres et d'une manière générale envers le monde de la recherche. Nous, chercheurs, évoluons dans un monde régi par des règles, plus ou moins implicites, qu'il faut connaitre, mais considérer avec un regard critique. Ce monde concurrentiel est en perpétuelle évolution, et les règles, les habitudes changent.
Une règle est fondamentale, intangible : l'intégrité scientifique. Pour définir l'intégrité scientifique, je me réfère à cette citation, extraite du rapport « Bilan et propositions de mise en œuvre de la charte nationale d'intégrité scientifique », élaboré en 2016 par P. Corvol : « L'intégrité scientifique est la conduite intègre et honnête qui doit présider à toute recherche. Consubstantielle de toute activité de recherche, c'est sur elle que reposent le savoir et la connaissance. L'intégrité scientifique n'est pas une question de morale mais elle s'appuie sur des principes moraux universels selon lesquels il est mal "de mentir, de voler…". La qualité et la fiabilité de la production scientifique dépendent d'elle. C'est sur elle que se fonde la société de la connaissance pour, en un mot, "croire à la science". Autant les questions d'éthique font débat, autant l'intégrité scientifique ne se discute pas. Elle se respecte, c'est un code de conduite professionnelle qui ne doit pas être enfreint. Elle s'impose en science, comme s'imposent les codes professionnels de déontologie pour les médecins

et les avocats. » Malheureusement cette intégrité peut être mise à mal, et nous voyons parfois des scientifiques de renom qui ont commis des manquements. Je cite ici deux exemples récents en France, qui ont été relayés dans la presse:

- Anne Peyroche, biologiste généticienne, employée par le CEA, présidente par intérim du CNRS, prix de la « Jeune Femme scientifique de l'année » en 2010, chevalier de l'ordre national du mérite, conseillère de la secrétaire d'Etat à la recherche Geneviève Fioraso en 2014-2015, mise à pied pour « des négligences fautives constitutives de manquements à l'intégrité scientifique de nature à porter atteinte à l'image de l'organisme et plus généralement de la recherche » ;
- Olivier Voinnet, biologiste français, membre de l'Académie des Sciences, médaille de bronze et d'argent du CNRS, accusé par des pairs de « manquement caractérisé aux règles et bonnes pratiques de présentation des données scientifiques », « volonté délibérée d'enjoliver les résultats » [1]. Olivier Voinnet est le premier français dans un classement des rétractations par auteur. Le site « Retraction Watch » [2] référence 39 articles de cet auteur qui ont fait l'objet d'une rétractation. Et il peut apparaitre comme un comble qu'un de ces articles (« An enhanced transient expression system in plants based on suppression of gene silencing by the p19 protein of tomato bushy stunt virus », PLANT J, Mar 2003) soit le quatrième article rétracté le plus cité au monde, avec 895 citations avant la rétractation qui a eu lieu en 2015, mais surtout 354 citations après rétractation…

Pour se prémunir de ce type de dérive, on voit depuis quelques années se multiplier les comités ou conseil d'intégrité dans beaucoup de structures. Ce besoin dénote malheureusement de l'ampleur de la tendance. J'ai cité ici deux affaires qui sont majoritairement restées dans le monde de la recherche, mais des défauts dans l'intégrité placent parfois dans le débat publique la recherche au même niveau qu'une croyance, qu'un avis. Nous en avons eu l'exemple flagrant l'année dernière, au plus dur de l'épidémie de COVID, avec des scientifiques qui ont voulu occuper le devant de la scène médiatique. Le plus connu en France est Didier Raoult, dont l'étude publiée [3] sur l'hydroxychloroquine ne répondait pas au standard de l'« International Society of Antimicrobial Chemotherapy's » [4], ce qui de manière étonnante n'empêche pas là aussi cet article d'être cité aujourd'hui plus de 2 400 fois. Cette étude, et la communication qui a été orchestrée autour, se sont traduits dans les faits par un véritable débat de société sur la chloroquine, chaque élu, journaliste, analyste y allant de son avis et emmenant la discussion sur l'efficacité du traitement loin des hôpitaux et des laboratoires de recherche, mais sur les plateaux télés et dans les repas de famille. Une équipe de chercheurs américains a également défrayé la chronique en publiant une étude sur les traitements contre cette maladie, prétendant traiter des données statistiques provenant de 169 hopitaux sur 3 continents [5, 6, 7]. Il s'agissait ici de mettre en avant les auteurs mais également une jeune société, Surgisphere, à la recherche d'une tribune pour se faire connaitre. Les auteurs ayant été incapables de produire les données sur lesquelles reposaient leur étude, les deux articles (dans les revues *The Lancet* et *New England Journal of Medicine*) ont fait l'objet d'une rétractation.

Cette fuite en avant peut s'expliquer par une autre règle, implicite celle-ci : la visibilité. Pour pouvoir exister dans cet univers ultra-concurrentiel, il faut être visible, plus que les autres. Cette visibilité est nécessaire pour obtenir des postes, des financements, et se gagne en publiant et en étant cité. Elle est d'autant plus nécessaire en cette période où les financements publics pour la recherche et le nombre de postes n'évoluent pas à la hausse. Pour illustrer ce point je prendrai l'évolution des postes a) au CNRS, où de 2005 à 2019, 1 581 postes de scientifiques (chercheurs, ingénieurs, techniciens) ont été supprimées [8] b) à l'Université, où 2 318 postes de maitres de conférences et 1 191 postes de professeurs étaient ouverts au recrutement en 2006, alors qu'il n'y en avait plus que respectivement 1 070 et 661 en 2019 [9]. Pour gagner en visibilité, mieux vaut être le premier, le plus rapide, et certains peuvent être tentés d'aller très vite, et malheureusement parfois trop vite, au détriment de la rigueur scientifique et de cette fameuse intégrité attendue de tout travail de recherche. On voit de plus en plus de stratégies pour publier, pour être cité, permettant d'augmenter des compteurs comme le facteur H. Certaines stratégies peuvent être mises à mal, comme par

exemple le retrait des auto citations dans le calcul du facteur H. Dans le même ordre d'idée, qui n'a jamais reconnu l'identité du reviewer d'un papier en voyant les papiers qu'il recommande de citer ? Les éditeurs scientifiques aussi rentrent dans ce jeu, en multipliant les revues pour offrir à tous cette visibilité. Nous pouvons citer l'éditeur Nature Publishing Group (qui a fusionné avec Springer en 2015 pour former un des plus grands éditeurs avec plus de 3 000 revues). Le groupe Nature possède pas moins de 50 titres. Les titres phares sont extrêmement prestigieux : Nature occupe le premier rang des revues scientifiques multidisciplinaires, avec un impact factor de 42.779 en 2019 (source InCites Journal Citation Reports [10]). Mais surfant sur le prestige de ces titres, d'autres revues du groupe font aussi le plein de publications, avec des facteurs d'impact plus modestes, comme par exemple Scientific Reports qui, avec un facteur d'impact de 3.998 en 2019 (source InCites Journal Citation Reports) se situe en-deçà de certaines revues spécialisées d'optique comme Optica (facteur d'impact 9.778), ou Advances in Optics and Photonics (facteur d'impact 14.690), et au niveau de revues comme Biomedical Optics Express (3.921) ou Optics Express (3.669). Malgré cela, cette revue est considérée par certains comme bien plus pretigieuse. En terme de communication, depuis quelques temps, nous avons franchi un nouveau cap avec l'utilisation des réseaux sociaux aussi dans le domaine de la recherche : certains partagent leurs travaux, leurs publications sur Twitter, LinkedIn ou d'autres réseaux. De nouveaux indicateurs « comptables » prennent en compte ces nouveaux média, comme par exemple les « altmetrics ». Cette recherche de visibilité peut aussi se traduire par le choix de sujets « à la mode ». Un exemple d'actualité est l'intelligence artificielle. S'inscrire dans une telle dynamique ouvre plus de perspectives en terme de publications, de citations, et de financements. Mais il me semble que la course à la publication et aux financements n'est pas garante d'un travail scientifique rigoureux et de qualité.

Cette visibilité permet d'occuper les meilleures places dans les différents classements, à la recherche de la fameuse « excellence ». Heureusement, les travaux scientifiques de grande qualité, et les équipes de recherche et les scientifiques de talent réussissent à obtenir cette visibilité. Mais certains chercheurs, parfois meilleurs communicants que scientifiques, prétendent à l'« excellence » en jouant avec ces règles et en se construisant des réseaux.

J'ai également pu constater depuis le début de mes travaux de thèse une individualisation de plus en plus importante de la recherche. Une illustration concrète de ce phénomène est l'apparition de nouveaux noms pour les équipes de recherche, les laboratoires : alors qu'avant le nom était souvent lié à la thématique de recherche, on voit de plus en plus de groupe qui prennent le nom de leur « leader ». Cette évolution est je pense en partie due à la diminution du nombre de postes, avec dans certaines équipes un fonctionnement à l'américaine avec un seul permanent, et uniquement des thésards / postdocs qui ne sont là que pour quelques années : aussi c'est cette personne qui naturellement porte les projets dans la durée et se met en avant. C'est également dû à l'évolution des financements : certains comme les ERC, le graal actuel, sont nominatifs et accordés à une personne. Enfin la concurrence de plus en plus accrue à tous les niveaux (mondial, national, même parfois local) favorise ce repliement : partager une bonne idée avec des pairs, des collègues pour l'améliorer, la renforcer n'est pas forcément une évidence pour tout le monde, en tout cas pas avant qu'elle n'ait été publiée... Il peut dès lors arriver que les ambitions personnelles prennent le dessus sur les enjeux collectifs. On peut cependant noter qu'à l'inverse, les travaux de recherche nécessitant des investissements très lourds, comme par exemple la physique des particules, sont aujourd'hui réalisés en mode collaboratif par des grosses équipes internationales. Nous pouvons citer les expériences ATLAS, qui sont publiées dans des articles écrits par plusieurs centaines d'auteurs répartis dans des dizaines de groupes à travers le monde, comme par exemple la référence [11]. Pour ma part, j'estime qu'un travail de recherche de qualité ne peut être réalisé qu'en vraie équipe, et que le proverbe africain bien connu : « Seul on va plus vite, ensemble on va plus loin » est parfaitement adapté à la recherche. Pour faire une publication rapidement, pour s'assurer la primeur d'une nouvelle idée, il peut être confortable de travailler seul, ou juste avec des « petites mains ». Par contre, pour bien comprendre avec rigueur ce qu'il en est et vraiment engranger du

savoir, solide, sur lequel on va capitaliser, l'intervention de collègues ou de pairs se révèle souvent utile.
Cette notion de « vitesse » dans la recherche est une conséquence des éléments cités au-dessus, mais il est rassurant de voir qu'elle n'est pas partagée par tous. Certains chercheurs, un peu à contre-courant de l'évolution actuelle militent pour la « slow science ». Un de leur slogan : « We are scientists. We don't blog. We don't twitter. We take our time » relate bien leur état d'esprit, et leur opposition à certaines dérives qu'on peut observer. Il me semble essentiel que, dans la communauté de la recherche, ce point de vue existe et soit partagé.
Pour ma part, sans m'inscrire dans ce mouvement de « slow science », je ne prétends pas à l'excellence. Par contre je prétends posséder les qualités essentielles pour être un bon scientifique : de la curiosité, de la rigueur, de l'enthousiasme, de l'intégrité et une certaine éthique.
Enfin, la situation actuelle de la recherche et son évolution sont aussi les conséquences des décisions politiques et des modifications géopolitiques. Sur ce point aussi il y aurait beaucoup de choses à dire. Par exemple le paysage de la recherche publique française est complexe, morcelé, avec de nombreux acteurs : le CNRS, les Universités, le CEA (pour commencer en citant dans l'ordre mes différents employeurs), mais également l'INSERM, l'INRIA, l'INRA, l'ONERA, l'IFREMER, des écoles d'ingénieurs… qui parfois s'organisent en COMUE, en initiative d'excellence (ou les deux), en laboratoire d'excellence, en Institut Carnot… A la création de ces différents organismes, de ces différentes structures, les missions devaient être complémentaires et dans des périmètres bien définis. La réduction des budgets publics pousse tous ces acteurs à postuler sur les mêmes financements institutionnels (ANR, …), à développer des partenariats avec des mêmes acteurs industriels, voire à favoriser l'émergence de start-up. Sur certaines thématiques, les frontières sont parfois floues et la complémentarité n'est plus évidente, voire s'est transformée en concurrence… Au niveau international, j'ai pu observer les évolutions depuis 2005 et le début de ma thèse. Tout d'abord l'émergence de la Chine : un indicateur fort est l'augmentation significative de la proportion d'articles rédigés par des équipes chinoises. De troisième pays publiant en 2005, avec un volume de publications comparable au Japon, au Royaume-Uni ou à l'Allemagne, loin derrière les Etats-Unis, la Chine était en 2018 le premier pays publiant devant les Etats Unis [12]. Ensuite, le recul de la France : sur cette même période (2005-2018), la France est passée du 6ème au 9ème rang, dépassée par l'Inde, l'Italie et la Corée du Sud. Sa part de publication mondiale a diminué d'un tiers sur cette période [12]. Pour mieux figurer dans cette compétition mondiale, une approche est d'attirer dans son pays les meilleurs scientifiques d'autres pays. C'est cette stratégie que suit depuis des années les Etats Unis : sur les 21 derniers prix Nobel Américains de physique depuis 2004, exactement un tiers étaient nés et avaient réalisé au moins une partie de leurs études dans un autre pays. La France, et notamment le CNRS et les Universités cherchent à amplifier les recrutements internationaux. Est-ce la meilleure stratégie, plutôt que d'encourager des jeunes chercheurs français, ou de se pencher sur la raison du désamour pour les études scientifiques en France ? On notera que les deux derniers Prix Nobel Français : Gérard Mourou en physique (2018) et Emmanuelle Charpentier en chimie (2020) ont obtenu cette prestigieuse récompense pour des travaux qui ont été réalisés respectivement aux Etats-Unis et en Allemagne. Emmanuelle Charpentier a d'ailleurs déclaré : « Je pense que la France aurait du mal à me donner les moyens que j'ai en Allemagne. Cela ne veut pas dire que tout le monde a des bons moyens en Allemagne. Il s'est trouvé que les circonstances m'ont emmenée à Berlin. Je pense que la recherche scientifique a besoin d'être soutenue par le gouvernement, par tous les fonds publics et privés. » [13]. Ce type de déclaration peut amener à réfléchir…
C'est aussi tous ces éléments qu'il faut partager avec les jeunes chercheurs. Le métier de chercheur est un métier magnifique, mais le monde de la recherche n'est pas idéal et est semé d'embuches. Cela fait partie de nos missions de leur faire prendre conscience de ces aspects. Et essayer, chacun à notre niveau, de défendre ce qui nous semble important.

Enfin, le passage de l'HDR est un moment de partage. Au moment de la rédaction, en partageant les versions préliminaires du manuscrit avec des collègues, des proches. Au moment de la soumission, en offrant ce document à l'examen du jury. Et pour finir au moment de la soutenance avec le public qui sera présent, par intérêt pour les travaux, ou simplement par sympathie pour l'orateur…

Je terminerai ce préambule en citant une dernière fois la COVID19, actrice importante des derniers mois. C'est elle qui m'a permis de franchir le cap et de me lancer dans la rédaction au printemps 2020. J'ai mis à profit le ralentissement d'activité et les longues soirées confinées pour concrétiser ce projet qui me tenait à cœur. Malheureusement ce confinement n'a pas suffi, et une année supplémentaire m'a été nécessaire pour finaliser ce document. Cette HDR sera donc pour moi un évènement de plus qui rendra cette période inoubliable.

Bonne lecture…

[1] Liste des articles du Monde:
« L'affaire Olivier Voinnet, une loupe posée sur l'intégrité scientifique », David Larousserie, 15 janvier 2019
« L'affaire Olivier Voinnet, une enquête qui n'a pas eu lieu », David Larousserie, 17 janvier 2019
« L'affaire Olivier Voinnet, le temps du grand nettoyage », David Larousserie, 17 janvier 2019
« L'Affaire Olivier Voinnet : la saga est relancée », David Larousserie, 21 janvier 2019
« Coups de théâtre dans l'affaire Olivier Voinnet », David Larousserie, 22 janvier 2019
« Affaire Olivier Voinnet : les fautes d'un biologiste vedette », David Larousserie, 22 janvier 2019
[2] https://retractionwatch.com/retraction-watch-database-user-guide/
[3] Gautret P, Lagier J.C., Parola P, Hoang V.T., Meddeb L., Mailhe M., Doudier B., Courjon J., Giordanengo V., Vieira V.E., Tissot Dupont H., Honoré S., Colson P., Chabrière E., La Scola B., Rolain J.M., Brouqui P., Raoult D., « Hydroxychloroquine and azithromycin as a treatment of COVID-19: results of an open-label non-randomized clinical trial », *International Journal of Antimicrobial Agents* **56**, 105949 (2020)
[4]https://retractionwatch.com/2020/04/06/hydroxychlorine-covid-19-study-did-not-meet-publishing-societys-expected-standard/#more-119224
[5] Mehra M.R., Desai S.S., Kuy S.R., Henry T.D., Patel A.N., « Cardiovascular Disease, Drug Therapy, and Mortality in Covid-19 », *N Engl J Med* **382** :e102 (2020)
[6] Mehra M.R., Desai S.S., Ruschitzka F., Patel A.N., « RETRACTED: Hydroxychloroquine or chloroquine with or without a macrolide for treatment of COVID-19: a multinational registry analysis », *The Lancet* (2020)
[7]https://retractionwatch.com/2020/06/02/nejm-places-expression-of-concern-on-controversial-study-of-drugs-for-covid-19/#more-119601
[8] https://sncs.fr/2018/10/30/lemploi-scientifique-au-cnrs-sengage-vers-un-decrochage-inedit/
[9] https://publication.enseignementsup-recherche.gouv.fr/eesr/FR/T844/qualification_et_recrutement_des_enseignants_chercheurs/
[10] https://journalprofile.clarivate.com/jif/home/?journal=NATURE&year=2019&editions=SCIE&pssid=H2-E9336dHvbZex2B9TDg9CLb0t6dajkuXYRG-18x2dWgBdPFyR8pxx6ZPQtUZbfUAx3Dx3DMqn0MIQiMOp9qvyx2FgbhbmQx3Dx3D-03Ff2gF3hTJGBPDScD1wSwx3Dx3D-cLUx2FoETAVeN3rTSMreq46gx3Dx3D
[11] Aad G., Abbott B., Abdallah J. et al., « Search for stable hadronising squarks and gluinos with the ATLAS experiment at the LHC », *Physics Letters B* **701**, pp 1-19 (2011).
[12] « La position scientifique de la France dans le monde et en Europe, 2005-2018 », Observatoire des Sceinces et Techniques (Hcéres) – Février 2021.
[13]https://www.francetvinfo.fr/monde/prix-nobel/video-la-prix-nobel-emmanuelle-charpentier-la-france-aurait-eu-du-mal-a-me-donner-les-memes-moyens-qu-en-allemagne_4133401.html

Table des matières

PREAMBULE I

TABLE DES MATIERES 1

INTRODUCTION 3

CONTEXTE SCIENTIFIQUE 3
PARCOURS 4
CONTENU DU MANUSCRIT 7

DE L'INSTRUMENTATION POUR… REPOUSSER LES LIMITES 9

I - DES LASERS IMPULSIONNELS POUR LA GENERATION DE NANOPARTICULES MONODISPERSES ET BIOCOMPATIBLES 9
I.1 - INTRODUCTION ET OBJECTIF DES TRAVAUX 9
I.2 - CADRE DES TRAVAUX ET COLLABORATIONS 11
I.3 - PRINCIPAUX RESULTATS 11
I.4 - ENCADREMENT 19
I.5 - PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS 20
II - UN LASER TERAWATT POUR CREER UNE SOURCE X POUR L'IMAGERIE PAR CONTRASTE DE PHASE 21
II.1 - INTRODUCTION ET OBJECTIF DES TRAVAUX 21
II.2 - CADRE DES TRAVAUX ET COLLABORATIONS 23
II.3 - PRINCIPAUX RESULTATS 23
II.4 - ENCADREMENT 33
II.5 - PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS 33

DE L'INSTRUMENTATION POUR … S'ADAPTER AUX ECHANTILLONS 35

I - UN MICROSCOPE GRAND CHAMP BIMODAL 36
I.1 - INTRODUCTION ET OBJECTIF DES TRAVAUX 36
I.2 - CADRE DES TRAVAUX ET COLLABORATIONS 37
I.3 - PRINCIPAUX RESULTATS 37
I.3.a - Imagerie sans lentille et ajout de la fluorescence 37
I.3.b - Microscope bimodal grand champ avec objectif 43
I.4 - ENCADREMENT 50
I.5 - PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS 51
II - UN MICROSCOPE DE FLUORESCENCE A FEUILLET DE LUMIERE POUR TRAVAILLER DANS DES CARTES MICROFLUIDIQUES 54
II.1 - INTRODUCTION ET OBJECTIF DES TRAVAUX 54
II.2 - CADRE DES TRAVAUX ET COLLABORATIONS 55
II.3 - PRINCIPAUX RESULTATS 55
II.4 - ENCADREMENT 61
II.5 - PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS 62

DE L'INSTRUMENTATION POUR… ETRE « EMBARQUEE » AVEC L'ECHANTILLON 63

I - DES SYSTEMES INTEGRES ET COMPACTS POUR LA FLUORESCENCE 64
I.1 - INTRODUCTION ET OBJECTIF DES TRAVAUX 64
I.2 - CADRE DES TRAVAUX ET COLLABORATIONS 65
I.3 - PRINCIPAUX RESULTATS 65
I.4 - ENCADREMENT 70
I.5 - PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS 71
II - VERS L'OPTOFLUIDIQUE 71

CONCLUSION 73

REMERCIEMENTS 74

BIBLIOGRAPHIE 76

PRODUCTION SCIENTIFIQUE 84

Introduction

Contexte scientifique

Depuis maintenant plus d'une dizaine d'années, les biotechnologies sont en plein essor. Elles sont présentes au plus près des personnes, dans les domaines de la santé, de la biométrie ou encore du bien-être, mais également dans l'environnement, l'agriculture, l'agroalimentaire. Les domaines de recherche associés à ces développements sont par essence multidisciplinaires, et impliquent des biologistes, des physiciens, des cliniciens, des chimistes, des numériciens, … Pour certaines applications, ces technologies répondent au besoin de réaliser des mesures, et reposent donc sur l'utilisation de capteurs, et éventuellement de sources associées, assemblés dans des systèmes de mesure. Dans ce contexte, la biophotonique occupe une place importante. En effet, en faisant interagir des photons avec des échantillons biologiques, il est possible d'imager ces derniers, de les analyser, tout en utilisant un rayonnement faiblement énergétique et donc peu invasif. Ainsi, l'ensemble du champ de l'Optique est emmené sur le terrain de la biologie pour appliquer ses principes et ceux de la photonique aux sciences du vivant. En d'autres termes, la biophotonique permet de traiter des problèmes biologiques ou médicaux à l'aide de méthodes et de technologies exploitant la lumière sous toutes ses formes. Parmi ces approches, nous pouvons citer de manière non exhaustive la microscopie (avec différents contrastes), l'imagerie endoscopique, les biocapteurs (puces à ADN, anneaux résonnants), la photothérapie et la photo-activation, l'optogénétique, la chirurgie au laser ou la bio-impression. La richesse et l'intérêt des travaux en biophotonique ces dernières années peuvent être mis en évidence par le Prix Nobel de Physique obtenu par Arthur Ashkin en 2018 pour les pinces optiques et leur utilisation sur des systèmes biologiques, ou par le Prix Nobel de Chimie décerné en 2014 à Eric Betzig, Stephan Hell et William E Moerner, pour le développement de la microscopie photonique à très haute résolution permettant de dépasser les limitations résolutives imposées par les lois de la diffraction.

Pour revenir plus précisément aux mesures optiques, les systèmes utilisés nécessitent avant tout de l'instrumentation : des sources lumineuses, pour générer les photons qui vont être utilisés, des éléments optiques simples (lentilles, miroirs…) ou plus évolués (modulateurs spatiaux de lumière, miroirs déformables…) pour mettre en forme les faisceaux lumineux, des capteurs pour détecter le signal lumineux, éventuellement des sondes pour révéler ou exalter des signatures optiques. Ces systèmes bénéficient des progrès des dispositifs et composants photoniques de hautes performances développés pour les applications scientifiques, mais également des progrès des composants grands publics portés par le développement des objets connectés et présentant des niveaux de performance, des niveaux d'intégration et des coûts extrêmement intéressants.

Les systèmes utilisés nécessitent également un traitement des données acquises pour obtenir un résultat, et cette manipulation des données prend une importance croissante, notamment avec l'émergence de l'intelligence artificielle. Aussi puissantes et statistiquement performantes que puissent être ces approches, il ne faut pas perdre de vue que pour être traitée, une information doit être présente dans la mesure, dans l'acquisition. Certains traitements prédictifs, ou des analyses « en aveugle », sans comprendre la signification physique, chimique ou biologique des critères de traitement peuvent d'ailleurs interroger.

De par ma formation, mes compétences et ma sensibilité d'« opticien instrumental », je suis persuadé que la qualité du signal enregistré doit être la meilleure possible, en regard des contraintes

imposées au dispositif. Ceci nécessite l'utilisation des « bons » éléments et composants optiques, pour apporter le contenu informationnel de la meilleure qualité possible. Aussi c'est dans ce contexte que s'inscrivent les travaux que j'ai menés, et qui consistent en quelques **contributions en instrumentation optique pour l'étude du vivant**.

Parcours

Opticien de formation, mes activités de recherche dans le domaine de l'instrumentation optique en biophotonique ont commencé avec ma thèse de 2005 à 2008. Cette thèse s'est déroulée sous la direction de Patrick GEORGES au sein du Centre de Photonique BioMédicale du Centre Laser de l'Université Paris Sud, en partenariat entre le Groupe Lasers et Biophotonique du Laboratoire Charles Fabry de l'Institut d'Optique (LCFIO, Palaiseau) et le Groupe Biophotonique du Laboratoire de Photophysique Moléculaire, aujourd'hui Institut des Sciences Moléculaires d'Orsay (LPPM, Orsay). L'objectif de ce travail était de développer un dispositif de microscopie de fluorescence en réflexion totale interne et résolue en temps. Ce travail m'a permis d'aborder plusieurs aspects de l'instrumentation optique. En effet, j'ai travaillé, sous l'encadrement de Frédéric DRUON (LCFIO), sur le développement de sources lasers solides impulsionnelles pompées par diodes, possédant des caractéristiques temporelles compatibles avec la mesure de temps de vie de fluorescence dans le domaine temporel (impulsions de quelques ps à une cadence de quelques MHz). En collaboration avec les collègues du XLim à Limoges (Vincent COUDERC, Philippe LEPROUX), nous nous sommes intéressés à l'élargissement spectral de ces sources par génération de supercontinua dans des fibres microstructurées, l'intérêt étant de posséder une unique source pour travailler avec tous les fluorophores. J'ai également travaillé, sous l'encadrement de Sandrine LEVEQUE-FORT, à la mise au point de l'excitation en réflexion totale interne à l'aide d'objectifs à forte ouverture numérique, et à la mise en place d'une voie de détection résolue en temps utilisant un intensificateur déclenché synchronisé sur la source laser, et relayé optiquement sur une caméra. Avec ce dispositif, nous nous sommes intéressés, avec des neurobiologistes, à l'étude d'un précurseur membranaire du peptide amyloïde impliqué dans la maladie d'Alzheimer.

Par la suite, de décembre 2008 à septembre 2009, j'ai effectué un postdoctorat dans le Laboratoire Photons Et Matière de l'ESPCI (LPEM, Paris). Dans l'équipe de Benoit DUBERTRET, j'ai travaillé avec Vincent LORIETTE au développement d'un microscope de fluorescence superrésolu, permettant de dépasser les limites de résolution imposées par la diffraction. Pour y parvenir, le laboratoire avait développé un dispositif de microscopie sous illumination structurée en trois dimensions, permettant d'améliorer la résolution latérale d'un facteur deux par rapport à la limite de diffraction, et également de localiser très précisément (à 20 nm près) les objets axialement. Ce montage utilisait des composants optiques modulables et aux propriétés très intéressantes pour structurer l'illumination au niveau de l'échantillon : des modulateurs spatiaux de lumières (SLM) à cristaux liquides. Mon travail a consisté à améliorer le dispositif existant, et à le confronter à des échantillons plus complexes, pour tenter de retrouver sur des cellules les performances du dispositif, démontrées sur des billes. Pour réaliser toutes ces images, nous avons travaillé essentiellement sur des échantillons marqués avec des quantum dots, synthétisés par les chimistes de notre équipe de recherche au sein du laboratoire. Dans ce mémoire, je ne reviendrai pas sur ces travaux. En effet, ayant réussi des concours de Maître de Conférence en 2009, mes activités sur

cette thématique de recherche ont duré moins d'un an. De plus, je n'ai pas eu l'occasion de travailler avec des étudiants dans cet environnement.

En septembre 2009, j'ai eu la chance d'être recruté en tant que Maître de Conférences par l'Université de la Méditerranée – Aix Marseille II, devenue Aix-Marseille Université (AMU) après la fusion des trois Universités d'Aix-Marseille. Pour mener mes activités de recherche, j'étais rattaché au laboratoire Lasers Plasmas et Procédés Photoniques (LP3). Et je dispensais mes enseignements pour le département de physique de l'UFR Sciences.
Concernant les activités de recherche, j'ai commencé par travailler sur la production de nanoparticules par interaction entre un laser impulsionnel et une cible solide dans un milieu liquide. Sur ce sujet, j'ai travaillé avec Andrei KABASHIN, qui a développé cette thématique au LP3. Ces nano-particules, produites de manière « propre », sans utilisation de réactifs ou de matériaux polluants ou toxiques, sont relativement compatibles avec le vivant, voire dans certains cas biocompatibles, et par conséquent destinées à être utilisées dans les organismes vivants. Ces particules peuvent être employées comme sonde pour l'imagerie, en utilisant leurs éventuelles propriétés photophysiques intrinsèques, ou en les couplant à des marqueurs fluorescents par exemple. Elles peuvent également être utilisées comme vecteurs, c'est-à-dire comme intermédiaires pour distribuer un principe actif vers une cible. Ces usages peuvent nécessiter des étapes de fonctionnalisation, réalisées par voie chimique après leur production. Nous avons travaillé avec différents matériaux solides, et différents régimes lasers impulsionnels (ns, ps, fs) pour produire des particules de manière maitrisée et reproductible, à des tailles contrôlées. Nous procédions également aux caractérisations morphologiques et photophysiques de ces particules. Ensuite des collaborateurs utilisaient et retravaillaient ces nanoparticules pour les amener vers le vivant : des pharmaciens de la faculté de médecine travaillaient sur la toxicité, les biologistes et chimistes sur la fonctionnalisation.
Par la suite, j'ai rejoint le projet ASUR (Applications des Sources laser Ultra-Rapides), projet d'envergure monté par le LP3. Sa concrétisation, notamment la construction de la plateforme laser (unique en Europe à son installation) et la mise en place des premières expériences, s'est étalée entre 2009 et 2014. La motivation première du projet ASUR est de s'intéresser aux interactions entre un laser ultra-rapide intense de forte puissance moyenne et différents matériaux. Différentes thématiques scientifiques ont été développées sur la plateforme. J'ai pour ma part, avec Marc SENTIS et Olivier UTEZA, participé à l'étude de l'interaction laser-matière pour des impulsions ultracourtes (< 100 fs), et surtout au développement de sources X secondaires à haute cadence, pour des applications en imagerie médicale. J'ai donc travaillé avec l'équipe sur la mise en forme du faisceau pour permettre le régime d'interaction fort flux souhaité, aussi bien au niveau de la conception de l'expérience, qu'à sa mise en place. La forte puissance crête des impulsions en sortie de cette chaine (10 TW) impose de travailler sous vide pour la génération des rayons X. Les interactions devant se produire à très fort flux à la surface de la cible, une attention particulière doit être apportée à la forme temporelle des impulsions, et à la focalisation de ce faisceau spectralement large. Enfin, pour ce projet, j'ai eu la charge d'initier le travail sur l'imagerie X par contraste de phase, en travaillant à la compréhension des phénomènes physiques pour l'application visée et au dimensionnement de ces expériences d'imagerie.
Concernant les activités d'enseignement, j'ai dispensé plus de 1 000 h sous différentes formes (cours en amphithéâtre, cours-travaux dirigés, travaux dirigés, travaux pratiques, encadrement de projets…) à différents niveaux (essentiellement Master et Licence à l'Université d'Aix Marseille). D'un point de vue disciplinaire, j'ai dispensé la majorité de mes enseignements autour de l'optique et des lasers, afin de transmettre mes connaissances les plus précises et approfondies, en lien avec ma formation et mes activités de recherche. J'ai également dispensé des enseignements plus généraux de physique, ce qui m'a permis d'affiner mes méthodes pédagogiques sur des contenus scientifiques moins avancés. J'ai été responsable de plusieurs unités d'enseignement, et également

responsable d'année et de filière en licence. Le détail de ces enseignements est rapporté dans la notice jointe en fin de ce manuscrit.

Quelques années plus tard, pour des raisons personnelles, j'ai souhaité rejoindre la région Rhône-Alpes. Malheureusement, j'ai été confronté à la difficile mobilité des enseignants chercheurs et j'ai été contraint de quitter le milieu Universitaire. Mais suite à une candidature spontanée au CEA-LETI de Grenoble, un poste d'Ingénieur Chercheur CEA m'a été proposé au sein du Département Microtechnologies pour la Biologie et la Santé (DTBS), dans le Laboratoire Images et Systèmes d'Acquisitions (LISA), devenu depuis le Laboratoires des Systèmes d'Imagerie pour le Vivant (LSIV). J'ai donc rejoint le LETI en juillet 2014, découvrant ainsi une nouvelle facette de la recherche appliquée, prioritairement tournée vers la valorisation et les partenariats industriels.
A mon arrivée, j'ai pris la responsabilité côté CEA du laboratoire commun monté avec la société HORIBA Medical. Le but de cette collaboration toujours d'actualité est de développer des systèmes d'imagerie grand champ couplés à de la préparation d'échantillons en microfluidique pour faire du diagnostic en hématologie. J'ai géré le projet et le partenariat de manière transverse pour le CEA, en binôme avec mon alter ego côté HORIBA, et j'étais également en charge des activités scientifiques en imagerie. La collaboration avec HORIBA s'est construite autour de l'activité en imagerie holographique sans lentille, qui a été initiée au LSIV par Cédric ALLIER en 2009. Cette imagerie semblait particulièrement adaptée aux applications visées, puisqu'elle permet, avec une instrumentation extrêmement simple et moyennant des étapes de traitement numériques, d'accéder en une seule acquisition à un grand champ de vue (plusieurs dizaines de mm^2) avec une résolution cellulaire (quelques μm), donnant ainsi accès à un nombre d'objets statistiquement représentatif (typiquement 10 000). Un point extrêmement intéressant dans ce projet est le couplage à la microfluidique, qui permet la préparation de l'échantillon (dilutions, réactions…). Ces aspects ont été étudiés avec Yves FOUILLET et les collègues du Laboratoire de Biologie et d'Architecture Microfluidique (LBAM) devenu Laboratoire de systèmes microfluidiques et de bio-ingénierie (LSMB) du DTBS. Pour les mêmes applications en hématologie, j'ai également travaillé avec HORIBA dans le cadre d'une thèse, en collaboration avec l'Institut Fresnel et Serge MONNERET. L'objectif de ces travaux était de développer un système d'imagerie avec des performances comparables en termes de champ et de résolution, mais utilisant la fluorescence comme contraste. Le montage développé, basé sur un objectif photographique macro permettant un grandissement 1 avec une grande ouverture, a permis également de faire de l'imagerie de phase quantitative en utilisant l'équation de transport de l'intensité (acronyme anglais TIE pour Transport of Intensity Equation). En imagerie holographique, j'ai également eu la charge d'une collaboration avec un autre partenaire industriel qui travaille sur des bactéries. Dans ce cadre, les montages utilisés, développés par d'autres collègues du LSIV, étaient toujours basés sur l'holographie en ligne sans bras de référence (comme en sans lentille), mais avec des optiques de microscopie classique (objectif et lentille de tube) proposant un faible grandissement (4x, voire 10x). Ce grandissement permet d'avoir un meilleur échantillonnage spatial des objets, et donc de récupérer plus d'informations sur les bactéries. Ces dispositifs permettent également de travailler en fluorescence.
Un des axes forts de développements du DTBS depuis quelques années est les organes sur puce, axe qui permet de fédérer quasiment l'ensemble des compétences de notre département (microfluidique, biologie, chimie, optique, électronique). En collaboration avec Florence RIVERA (collègue du LSMB) et Marie CARRIERE (biologiste travaillant à l'Institut de Recherche Interdisciplinaire de Grenoble de la Direction de la Recherche Fondamentale –DRF- du CEA), j'ai monté un projet pour développer un système de microscope de fluorescence à feuillet de lumière pour imager la vascularisation d'un organoïde à l'intérieur d'une carte microfluidique. Dans ce projet, qui a obtenu un financement de la direction scientifique du CEA, nous ne cherchons pas à faire de l'imagerie à très haute résolution, mais là encore à trouver le compromis pour résoudre nos objets d'intérêt (les cellules endothéliales) sur un grand champ, afin d'étudier leur organisation en vaisseaux. Toujours sur cette thématique des organes sur puce, j'ai également participé à un projet

structurant du DTBS, réalisé en partenariat avec les biologistes de la DRF, et les collègues du Centre Hospitalier Universitaire de Grenoble, qui s'intéresse au pancréas sur puce. L'objectif est de maintenir en vie dans une puce des éléments constitutifs du pancréas (les îlots de Langehrans) et d'assurer le suivi de paramètres clés pour leur fonction (viabilité, oxygénation, production d'insuline) grâce à des capteurs embarqués.
Quelque peu frustré d'utiliser des composants optiques classiques achetés en ligne chez des fournisseurs bien connus alors que le LETI dans ses salles blanches développe des technologies en rupture, je me suis rapproché de collègues travaillant dans le Département Optique et Photonique (DOPT) du LETI sur les diodes électroluminescentes organiques (OLED). Avec Etienne QUESNEL et Benoit RACINE, j'ai monté un projet qui porte sur la conception et la caractérisation d'une source OLED originale, qui servira de source lumineuse d'excitation d'une instrumentation de terrain (POC – Point of Care) de détection de fluorescence ultracompacte couplant micro-fluidique et détection optique. Ce projet, financé par la direction scientifique du LETI, nous permet d'utiliser les spécificités des LEDs organiques, et notamment leur possibilité d'émettre avec des géométries originales sortant de la classique organisation matricielle en pixels de petite taille, pour les intégrer dans un système d'analyse miniaturisé.
Enfin, depuis janvier 2020, j'assure pour la direction du LETI le pilotage du programme WECARE (pour WEarable for Chronic diseAse RElief). Ce programme fait partie des six programmes transverses et structurants lancés, pilotés et financés par la direction du LETI (les autres programmes concernent l'informatique quantique, l'intelligence artificielle embarquée, la 6G, le LIDAR automobile, et la réalité mixte). WECARE a pour objectif de développer des dispositifs médicaux portés pour accompagner les patients souffrant de maladies chroniques. Ces dispositifs, d'un encombrement minimal et d'une grande facilité d'utilisation pour se faire oublier par les patients, permettront un suivi des paramètres physiologiques pertinents pour la maladie, avec une précision compatible avec le grade médical. Ils seront couplés à de l'accompagnement en temps réel, notamment sur le plan cognitif (ex : gestion du stress), pour aider à mieux vivre la pathologie et compléter efficacement les protocoles thérapeutiques. Dans ce domaine ultra concurrentiel associé à des marchés très dynamiques, les solutions proposées s'appuieront sur tout le savoir-faire et les technologies différentiantes du LETI. Dans un premier temps, les travaux sont focalisés sur l'hypertension et la mesure de pression artérielle. Le dispositif de mesure envisagé utilise différentes modalités, mais est basé sur une méthode de mesure optique appelée photoplethysmographie. Avec mes collègues Patrice CAILLAT et Rémi GERBELOT du DTBS, nous avons construit un plan de travail ambitieux d'envergure impliquant treize laboratoires dans les cinq départements du LETI (le DTBS, le DOPT, le Département SYStèmes : DSYS, le Département COmposants Silicium : DCOS, CLINATEC). L'avancée actuelle des travaux ne me permet pas de décrire ces activités dans le présent manuscrit.

Contenu du manuscrit

Après avoir posé brièvement le contexte scientifique général des travaux, puis synthétisé en quelques pages mon parcours, je vais présenter plus précisément dans la suite certains travaux menés au cours de ces seize ans de recherche dans différents laboratoires. Pendant ces années, j'ai abordé un certain nombre de thématiques. Le lien entre toutes ces activités a été l'instrumentation optique, qui constitue vraiment mon cœur de compétences.

Pour la rédaction de ce manuscrit, j'ai dû faire des choix, afin de proposer un manuscrit qui réponde aux exigences de l'école doctorale, tout en étant je l'espère agréable à lire. Aussi, je me suis concentré sur les activités pour lesquelles j'ai travaillé avec des étudiants (stagiaires de Master 2, doctorant) ou des jeunes chercheurs (postdoc).

Dans une première partie, intitulée « De l'instrumentation pour… repousser les limites », je vais revenir sur les travaux impliquant une instrumentation optique relativement lourde, et contribuant à des avancées un peu plus fondamentales en physique, avec toujours bien sûr comme application l'étude du vivant. Les activités développées dans cette partie reposent sur de l'instrumentation de laboratoire de physique. Ces travaux ont été réalisés au laboratoire LP3.

Dans une seconde partie, intitulée « De l'instrumentation pour… s'adapter aux échantillons », je présenterai des travaux impliquant des concepts de la physique connus, mais proposant d'adapter le dispositif optique et ses performances aux échantillons biologiques étudiés. L'instrumentation optique décrite ici est moins complexe et volumineuse que dans la partie précédente, transposable dans des laboratoires de biologie. Cette partie revient sur les premières activités de recherche que j'ai menées en arrivant au CEA-LETI.

Enfin, une troisième et dernière partie intitulée « De l'instrumentation pour… être embarquée avec l'échantillon », développera les travaux prenant également en compte une contrainte d'intégration, afin de réaliser des systèmes optiques fonctionnant au plus près de l'échantillon biologique, par exemple dans une carte microfluidique, pour délocaliser les systèmes de mesure dans un environnement hors laboratoire. Il sera ici question des travaux en cours, et des perspectives à venir.

Pour conclure, je reprendrai les principaux éléments développés dans le document, et synthétiserai l'ensemble des activités d'encadrement réalisées.

Chaque partie est structurée de la même façon : quelques mots introduisent la partie, puis pour chacune des activités présentées, le lecteur retrouvera une introduction avec les objectifs des travaux, le cadre de ces travaux et les collaborations, les principaux résultats, les travaux encadrés et enfin les communications sur la thématique.
Dans la suite, deux référencements sont utilisés pour la bibliographie : pour les références provenant de l'état de l'art, j'ai adopté un classement avec le nom du premier auteur et la date de publication. Pour le renvoi aux productions auxquelles j'ai participé, la référence est une lettre suivie d'un chiffre. Une notice détaillée reprenant l'ensemble de mes activités est jointe à la fin de ce manuscrit.

De l'instrumentation pour… repousser les limites

Dans cette première partie vont être présentés des développements instrumentaux assez lourds, réalisés dans l'environnement d'un laboratoire de physique, avec les équipements et les compétences associés. Ces travaux ont été réalisés entre 2009 et 2014 au Laboratoire Lasers Plasmas et Procédés Photoniques (LP3) à Marseille. La finalité de ces développements était l'étude du vivant, mais un autre objectif de toute première importance était la compréhension des mécanismes physiques mis en jeu. Les spécificités du rayonnement laser permettent de créer des régimes d'interaction lumière-matière uniques, en concentrant l'énergie spatialement (jusqu'à des volumes de quelques μm^3), temporellement (jusqu'à des durées d'impulsions de quelques fs), dans des bandes spectrales fines (quelques nm ou dizaines de nm). Ces différents paramètres varient suivant la nature du milieu amplificateur du laser utilisé, son régime de fonctionnement temporel (cadence de répétition, durée des impulsions), et les éventuels étages supplémentaires d'amplification ou de mise en forme spatio-temporelle des impulsions délivrées. Autant de paramètres qui impactent les processus physiques en jeu lors de l'interaction.
Dans ce chapitre vont être traités les développements instrumentaux menés pour deux problématiques :

- La production de nanoparticules aux propriétés maîtrisées pour l'imagerie et la vectorisation. Ces nanoparticules doivent posséder les propriétés physiques (taille, morphologie, propriétés photophysiques) leur permettant de remplir leur mission.
- La création d'une source X avec des propriétés de cohérence permettant de faire de l'imagerie de « contraste de phase » (nous préciserons ce terme dans ce contexte) pour l'imagerie médicale et plus précisément la mammographie.

Comme vous pourrez le constater dans ce chapitre, ces travaux m'ont amené sur le front de la connaissance des mécanismes de l'interaction entre la lumière et la matière. L'instrumentation développée a permis de mettre en place ou de réaliser des expériences pour se rapprocher des limites du savoir actuel dans le domaine, en espérant les repousser.

I - Des lasers impulsionnels pour la génération de nanoparticules monodisperses et biocompatibles

I.1 - Introduction et objectif des travaux

Les nanoparticules inorganiques sont des objets fascinants, qui aiguisent la curiosité des scientifiques depuis plus de 20 ans. Leurs propriétés uniques leur ont également permis de conquérir le monde de l'industrie (cosmétique, agro-alimentaire…), alors même que certains de leurs effets, notamment sur la santé humaine, sont encore mal connus. Sur ces objets, les effets de taille sont impressionnants : les matériaux à des échelles micrométriques possèdent des propriétés comparables au matériau « massif », mais à l'échelle nanométrique (de quelques dixièmes à quelques

centaines de nm) ils présentent des caractéristiques structurelles, thermodynamiques, électroniques, spectroscopiques et chimiques bien différentes. De plus, l'augmentation du rapport surface à volume augmente considérablement les processus de surface.
Dans le biomédical, les nanoparticules d'or sont très populaires [Dreaden 2012] : en plus d'être bien toléré par le vivant, l'or possède des propriétés plasmoniques extrêmement intéressantes [Amendola 2017]. Ces nanoparticules sont utilisées comme agent de contraste pour l'imagerie [Wu 2019] ou encore pour le traitement du cancer [Singh 2018]. Dans ce dernier exemple, les nanoparticules d'or permettent la détection de la tumeur, la délivrance ciblée de drogues, ainsi que des thérapies photodynamiques ou photothermiques [Vines 2019]. Concernant l'imagerie, les boites quantiques colloïdales, ou quantum dots, constituées de semiconducteur, sont un marqueur fluorescent répandu aux propriétés photophysiques extrêmement intéressantes [Dubertret 2002] [Michalet 2005]. Les nanoparticules de silicium peuvent présenter des comportements comparables aux quantum dots à semiconducteur classique (ZnS, CdSe, CdTe) pour l'imagerie biologique [Erogbogbo 2008]. Le silicium permet également de produire des vecteurs pour la délivrance de drogues [Tasciotti 2008], ou des photosensibilisateurs utilisés en thérapie photodynamique [Timoshenko 2006] ou photothermique [Hong 2011].
Quelle que soit la voie utilisée, la production de nanoparticules est complexe. Les différents paramètres de la méthode choisie doivent être maîtrisés, afin de produire des nanoparticules de la bonne composition chimique, de la taille désirée avec une faible dispersion, possédant les propriétés de morphologie ou encore de cristallinité souhaitées. De plus, ces objets doivent être stables en solution dans le temps, pour prévenir toute agglomération ou tout grossissement.
La toxicité est toujours une considération de premier ordre quand on veut travailler avec le vivant. Certaines nanoparticules inorganiques, comme les quantum dots, utilisent des matériaux (tel le Cadmium) intrinsèquement toxiques. Pour faire accepter ces objets par le vivant, des étapes chimiques supplémentaires d'encapsulation ou autre, sont indispensables. A l'inverse, certains matériaux sont biocompatibles. C'est le cas du Silicium, toléré par le vivant jusqu'à certaines concentrations [Choi 2009]. Le Silicium peut se décomposer dans les organismes jusqu'à l'acide orthosilicique ($Si(OH)_4$), qui peut être excrété du corps [Park 2009].
Une autre problématique est la pureté des nanoparticules inorganiques. Les voix de synthèse chimiques classiques peuvent se révéler complexes avec un nombre d'étapes important. Ces méthodes peuvent provoquer des contaminations des nanoparticules, avec des réactifs de départ (qui peuvent se révéler parfois dangereux), des sous-produits de réaction, des ions ou encore des agents tensioactifs. Dans le cas de l'or, la voix chimique classique peut mener à la contamination des nanoparticules [Balasubramanian 2010], et certains produits issus de la réaction peuvent créer de la toxicité pour des matériaux a priori non toxiques [Alkilany 2009].

L'ablation laser en milieu liquide est apparue dans les années 2000 comme une alternative physique à la synthèse chimique conventionnelle [Neddersen 1993], [Mafuné 2000], [Simakin 2001]. Cette méthode est basée sur le « décollement » (ou ablation) de matière du matériau solide de la cible, directement induit par une impulsion laser, ce qui donne lieu à la formation de nano-agrégats qui sont libérés dans l'eau et coalescent pour former des nanoparticules en solution. La fragmentation laser de solutions colloïdales déjà formées permet d'améliorer la distribution en taille des nanoparticules [Besner 2007]. Cette fragmentation bénéficie d'une géométrie tridimensionnelle, volumique, qui offre des conditions d'ablation et de formation des particules plus homogènes, comparée à la géométrie planaire conventionnelle de l'ablation laser à partir d'une cible solide. Différents mécanismes physiques sont en jeu au cours de l'ablation, et la nature des impulsions lasers (durée, fréquence, énergie…) va en privilégier certains au détriment d'autres.
L'ablation laser en milieu liquide est parfois qualifiée par ses utilisateurs de « chimie propre », car cette ablation laser peut être réalisée à partir d'un matériau pur dans une solution aqueuse, juste par l'utilisation d'un rayonnement laser. De plus, elle ne requiert pas nécessairement de produits chimiques, et ne produit pas de déchets.

Ainsi, l'objectif de ces travaux était de développer des techniques de synthèse de nanoparticules de différents matériaux par ablation laser contrôlée. Pour ce faire, la compréhension des mécanismes en jeu était essentielle pour obtenir des nanoparticules avec des tailles de quelques nanomètres et une très faible dispersion en taille. Ces nanoparticules ont ensuite été étudiées afin de caractériser leurs propriétés physiques, leur stabilité, et leur biocompatibilité.

I.2 - Cadre des travaux et collaborations

En arrivant au LP3, j'ai pris part aux activité de recherche menées par Andrei KABASHIN sur ce thème. De par mes compétences, je suis intervenu essentiellement sur les montages optiques et la mise en forme spatiale et temporelle des impulsions lasers pour produire les nanoparticules, aidé par l'ensemble des collègues du LP3 compétents dans ce domaine. J'ai également pris part à certaines caractérisations des objets produits.
Andrei est un des spécialistes mondiaux de la production de nanoparticules par ablation laser, et il a construit des collaborations avec un grand nombre d'équipes de recherche de premier plan à travers le monde. Dans son sillage, j'ai pu prendre part aux collaborations avec l'équipe de Saulius JUODKAZIS à l'Université de Technologie Swinburne de Melbourne (Australie), l'équipe de Victor TIMOSHENKO à l'université d'État Lomonossov de Moscou (Russie), l'équipe de Vladimir CHIRVONY à l'Université de Valence (Espagne) et l'équipe de Alexander GRIGORENKO de l'Université de Manchester (Royaume-Uni). Pour l'utilisation de ces nanoparticules dans le vivant, Andrei avait construit une collaboration avec l'équipe de Diane BRAGUER au Centre de Recherches en Oncologie biologique et Onco-pharmacologie d'Aix-Marseille Université et du CNRS. C'est avec cette équipe que sont menés les travaux sur la toxicité et la « sécurité » de ces nanoparticules.
A mon niveau, j'ai été moteur dans la construction de la collaboration avec les collègues du Centre Interdisciplinaire de Nanosciences de Marseille (CiNaM) à Luminy. C'est dans ce cadre que nous avons réalisé les caractérisations de nanoparticules au microscope électronique en transmission ou par diffraction X, et que nous avons également mené les expériences sur la production de nanoparticules de Lanthanides (Anthony D'ALEO et Frédéric FAGES).

I.3 - Principaux résultats

Les mécanismes en jeu lors de la production de nanoparticules par ablation laser permettent de leur conférer des propriétés uniques, de repousser les limites de ces nano matériaux. Ce sont les sources lasers qui en sont à l'origine. Nous allons ici nous concentrer sur les sources lasers impulsionnelles utilisées et l'influence de leurs paramètres sur les mécanismes de production des nanoparticules. Les activités de recherche sur ces objets possèdent beaucoup d'autres aspects, notamment leur caractérisation physique ou chimique, la chimie pour fonctionnaliser leur surface ou ajouter d'autres propriétés, la biologie pour les intégrer dans le vivant, puis la biochimie et la biophysique pour étudier leurs propriétés en interaction avec le vivant…

L'ablation par laser impulsionnel implique des processus physiques et chimiques complexes, parmi lesquels le chauffage, la fusion, la vaporisation, la formation et la propagation d'ondes de choc, la

création et l'expansion de plasmas, ou encore des réactions chimiques. Les paramètres des nanoparticules produites sont déterminés principalement par les mécanismes de l'ablation, qui dépendent des caractéristiques des impulsions lasers. L'objectif n'est pas ici de rentrer dans le détail de ces mécanismes, mais de donner au lecteur des éléments pour comprendre l'importance des sources lasers, et les frontières que repoussent l'utilisation d'impulsions ultracourtes.

Pour commencer, le choix de la longueur d'onde est important, puisque le coefficient d'absorption de la cible en dépend fortement. Par exemple, pour les cibles métalliques, il est connu que les radiations ultraviolettes sont facilement absorbées par les transitions interbandes, alors qu'à l'inverse les impulsions dans le proche infrarouge sont absorbées par les défauts et les impuretés de la cible [Nichols 2006]. Les impulsions ultracourtes (ps ou fs) permettent d'atteindre des intensités élevées, et dans ces conditions, la photo-ionisation et l'absorption multiphotonique deviennent les mécanismes principaux d'absorption de l'énergie, même dans les longueurs d'onde proches infrarouges [Zhigilei 2009]. Pour ce type d'expériences, ce sont essentiellement des lasers solides qui sont utilisés, comme les lasers Nd :YAG (longueur d'onde fondamentale à 1064 nm), ou les lasers titane saphir, émettant autour de 800 nm.

Ensuite, la quantité d'énergie laser déposée dans le matériau affecte de manière critique l'efficacité du processus d'ablation. Le rendement de l'ablation augmente linéairement avec l'énergie de l'impulsion [Mafuné 2001], mais ce phénomène induit une augmentation de la taille des nanoparticules, et une plus grande dispersion en taille. Cela peut s'expliquer par la plus grande quantité de matériel ablaté, ce qui entraîne une concentration plus importante de nanoagrégats dans la plume du plasma généré par le laser, favorisant leur croissance.
Les conditions de focalisation du rayonnement laser sur la cible, c'est-à-dire la manière dont cette énergie est concentrée spatialement, influence également les mécanismes. Ainsi, pour une densité d'énergie, ou fluence (exprimée en J/cm^2), donnée, quand la taille de la tâche de focalisation augmente, le rendement de l'ablation augmente également [Sobhan 2010].

Les processus présentés dans ce chapitre sont générés par des lasers impulsionnels, ainsi les propriétés temporelles des sources utilisées sont primordiales, avec au premier rang d'entre elles la durée des impulsions. Les phénomènes physiques sont sensiblement différents suivant qu'il s'agisse d'impulsions « longues » (ns, µs, voire émission continue) ou d'impulsions ultracourtes (fs).
L'interaction entre des impulsions « longues » et la cible dans de l'eau ou un environnement liquide mène généralement à la formation de nanoparticules largement dispersées en taille, et partiellement agglomérées, dont la taille moyenne varie de quelques dizaines à quelques centaines de nm [Neddersen 1993], [Mafuné 2000], [Simakin 2001]. L'ablation laser en régime ns peut être considérée comme une ablation par chauffage. L'énergie laser absorbée chauffe d'abord la surface cible jusqu'au point de fusion, puis jusqu'à la température de vaporisation [Chichkov 1996]. De plus, l'onde de choc induite par le laser peut provoquer une ablation mécanique « secondaire » conduisant à la formation de gros fragments de formes irrégulières.
Les propriétés en taille des nanomatériaux peuvent être sensiblement améliorées par l'utilisation d'impulsions ultra courtes [Semaltianos 2010], [Intartaglia 2012]. Dans ce cas, le transfert d'énergie entre le rayonnement et la cible est rapide, plus rapide que le temps de relaxation thermique : on peut considérer l'ablation en régime femtoseconde comme un phénomène non thermique. Le mécanisme dominant est alors la photo-ionisation [Zhigilei 2009]. De plus, les intensités extrêmement élevées atteintes dans ce régime ($>10^{12}$ W/cm^2 en intensité crête au point focal contre moins de 10^{10} W/cm^2 en régime ns) créent des conditions extrêmes. Des phénomènes non linéaires tels que la génération de supercontinua ou l'absorption multiphotonique sont induits, phénomènes qui peuvent être bénéfiques pour l'interaction avec les particules dispersées dans la solution. Ces phénomènes sont d'ailleurs utilisés pour la fragmentation de colloïdes déjà formés (par voie laser ou par une autre méthode) pour améliorer leur distribution en taille : dans ce cas la géométrie

d'interaction dans le volume du liquide permet d'avoir des conditions plus homogènes. En élargissant le spectre de l'impulsion initiale, la génération de supercontinua permet d'améliorer l'efficacité d'absorption par les particules. Dans la plupart des cas, les nanoparticules produites par ablation ou fragmentation fs sont relativement petites (10 nm ou moins), et sont caractérisées par une faible dispersion en taille et une stabilité importante en solution [Sylvestre 2005].
Ensuite, la cadence de répétition des impulsions est un autre paramètre temporel sur lequel on peut jouer. Intuitivement, on associe une augmentation de la cadence du laser à une augmentation de l'efficacité de production des nanoparticules, mais il existe une limitation liée à l'apparition d'une bulle de cavitation. Lorsque l'intervalle entre deux impulsions est plus court que la durée de vie de la bulle de cavitation (typiquement entre 10^{-4} et 10^{-3} s), l'impulsion laser peut interagir avec cette dernière. Cette interaction provoque une forte diffusion de la lumière, et par conséquent réduit l'énergie laser atteignant la cible. Ainsi la fréquence de répétition maximale, au-delà de laquelle l'ablation est perturbée par cette bulle se situe autour de 10 kHz [Wagener 2010].
Enfin, la durée d'interaction, qui équivaut au nombre d'impulsions, est le dernier paramètre relevé ici. La quantité de matériau ablaté augmente avec le nombre d'impulsions laser, mais un grand nombre d'impulsions laser peut modifier la cible : soit sa morphologie, soit sa composition du fait de son interaction avec des espèces issues d'une solution [Mafuné 2001]. Par conséquent, pour des conditions d'ablation identiques, il est essentiel de déplacer en continu la cible afin d'éviter l'ablation de la même zone. Enfin, des taux de répétition élevés et un long temps d'ablation peuvent conduire à l'augmentation de la concentration locale de nanoagrégats dans un volume limité près de la cible. Ceci aura pour effet d'une part de maximiser leur coalescence et leur agglomération, mais également d'augmenter la diffusion et l'absorption de la lumière, ce qui conduit à un élargissement de la distribution des tailles des nanoparticules. Ce problème de la concentration locale élevée des nanoparticules peut être résolu en agitant la solution ou en utilisant une cuve à circulation liquide.
Ces éléments introduisant les différents mécanismes étant présentés, nous allons maintenant nous concentrer sur les montages expérimentaux et l'instrumentation optique utilisée.

L'élément central est bien entendu la source laser impulsionnelle. Différentes sources laser ont pu être utilisées au cours de ces travaux, mais la plupart des expériences a été réalisée avec une source laser femtoseconde infrarouge pompée par diode, couplée à un amplificateur pour atteindre des énergies par impulsion plus importantes. Nous n'allons pas revenir dans ce manuscrit sur la physique des lasers et le fonctionnement des sources impulsionnelles [Blandin 2008].
Le système laser femtoseconde utilisé est le modèle S-Pulse développé et commercialisé par la société Amplitude Systèmes (Pessac, France). Il est basé sur un oscillateur délivrant un train d'impulsions lumineuses de faible énergie (1 – 10 nJ) de durée 450 fs à haute cadence de répétition (50 MHz). Le milieu amplificateur est un cristal de tungstate de gadolinium et de potassium (KGW) dopé avec des ions Ytterbium (Yb) : la transition de l'ion Yb à 1025 nm est privilégiée pour l'émission laser. Cet oscillateur est couplé à un amplificateur dit régénératif afin d'augmenter l'énergie lumineuse par impulsion. En quelques mots, les impulsions étirées temporellement sont piégées dans une cavité amplificatrice et multiplient les passages dans le milieu à gain avant d'être éjectées grâce au module de commutation optique à effet Pockels, puis recomprimées. En fonctionnement nominal, le train d'impulsions (de durée égale à 450 fs) en sortie de la chaine complète a une cadence de 10 kHz et une puissance moyenne de 900 mW, ce qui correspond à une énergie par impulsion de 90 µJ, soit une amplification par un facteur supérieur à 10 000. En augmentant la cadence, on atteint des énergies moins élevées.

Pour procéder à l'ablation, la cible solide, typiquement un parallélépipède de matériau pur de surface 1 cm^2 et d'épaisseur millimétrique, est immergée dans une petite cuve remplie d'eau déionisée. La cible est perpendiculaire au faisceau laser, et est montée sur des platines de translation se déplaçant lentement (<1 mm/s) pour éviter d'ablater la même région de la cible. Le plan d'une réalisation mécanique est représenté figure 1.1. La cuve, opaque, est positionnée dans un support

à hauteur du faisceau laser, et fixée sur le marbre. Cette cuve possède un hublot de quartz, permettant de travailler sur une grande plage de longueurs d'onde allant de l'ultraviolet à l'infrarouge, et qui transmet le faisceau pour le faire interagir avec la cible. Ce hublot permet également d'éviter une interface air/eau potentiellement irrégulière, qui pourrait altérer la focalisation sur la cible. A l'opposé du hublot, derrière la cible, un petit moteur est positionné pour actionner une hélice et homogénéiser la solution. La cible est fixée sur un bras qui vient plonger dans la cuve. Ce bras est positionné grossièrement (au mm) grâce à un système de glissière, et des translations motorisées micrométriques permettent d'ajuster plus finement la position de la cible, et de la déplacer par rapport au faisceau laser. Pour connaître la quantité de matériau ablaté, une pesée précise de la cible est réalisée avant et après ablation.

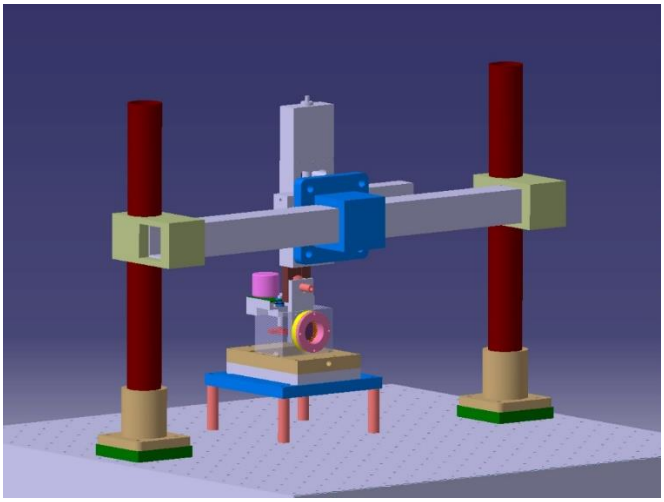

Figure 1.1 : Plan de la cuve et du système mécanique pour l'ablation laser sur cible solide.

La mise en forme du faisceau est simple. Grâce à l'amplificateur régénératif, la qualité de faisceau est très bonne (M^2 proche de 1). Pour une cadence et une énergie de sortie d'amplificateur données, l'énergie des impulsions incidentes sur la cible peut être modifiée grâce à une lame demi-onde couplée à un analyseur. Un doublet permet d'obtenir une focalisation de bonne qualité du faisceau de diamètre initial 2,3 mm. Des focales de l'ordre de 75 mm sont typiquement utilisées. La lentille et la cible sont positionnées de telle sorte que la cible se situe juste avant le point de focalisation du laser, de manière à optimiser la production de nanoparticules. Différents miroirs de renvoi sont utilisés sur le marbre pour acheminer le faisceau jusqu'à la cuve, et de manière perpendiculaire à la cible. Un schéma typique de l'expérience est rapporté figure 1.2.

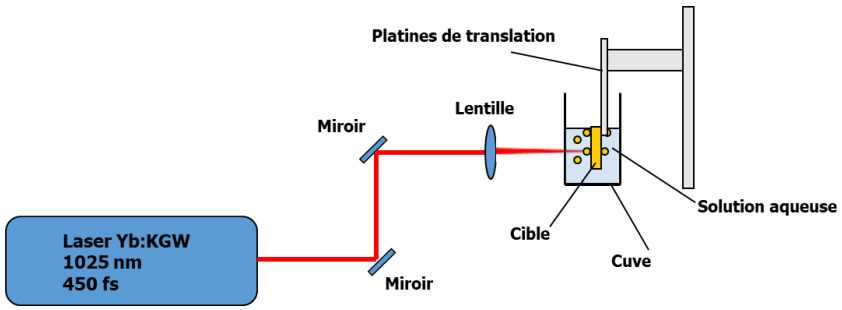

Figure 1.2 : Schéma typique d'une expérience d'ablation.

Pour les expériences de fragmentation, le montage expérimental est légèrement différent. En effet, dans ce cas, les contraintes sont moins fortes sur la position du point de focalisation du laser, puisque l'interaction avec les particules ou agrégats déjà formés peut se faire dans l'ensemble du

volume de la solution. Aussi, il semble moins problématique pour le faisceau d'arriver par le dessus de la cuve, en traversant l'interface air / solution aqueuse. De plus cette direction et ce sens de propagation du faisceau dans la cuve garantissent une plus grande sécurité, puisque dans ce cas l'ensemble du faisceau n'est pas bloqué par l'échantillon et continue à se propager après l'interaction. Pour bien homogénéiser la solution et garantir des conditions d'interaction identiques pour l'ensemble des particules présentes dans la solution, un agitateur magnétique est utilisé, permettant un brassage plus important que l'hélice. La source laser est quant à elle utilisée dans les mêmes conditions, les miroirs de renvoi sont positionnés différemment de manière à arriver par le dessus de la cuve, et le même doublet de focale typique 75 mm est utilisé pour la focalisation. La lentille est positionnée de telle sorte que le point de focalisation se situe au milieu de la cuve. Un schéma est rapporté figure 1.3.

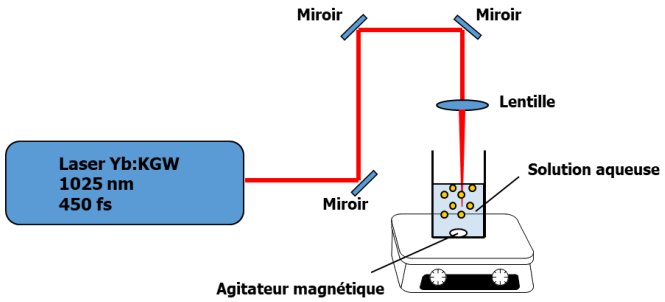

Figure 1.3 : Schéma typique d'une expérience de fragmentation.

Une petite évolution du montage classique d'ablation laser a été proposée pour suivre l'évolution de la quantité de nanoparticules produites et l'efficacité d'ablation. Lors de la production de nanoparticules par ablation laser à partir d'une cible de Titane, de Silicium ou d'Or, la solution aqueuse se trouble, se colore respectivement en bleu, brun ou rouge, et s'opacifie. L'idée était de suivre cette évolution de la solution en relevant les variations de puissance lumineuse d'un faisceau transmis à travers la cuve. Pour réaliser cette mesure, le faisceau collimaté d'une diode laser d'alignement émettant à 633 nm est propagé à travers la cuve (transparente dans ce cas) dans une direction perpendiculaire au faisceau interagissant avec la cible. Une mesure de la puissance transmise est réalisée grâce à un puissancemètre de l'autre côté de la cuve. Le schéma expérimental est rapporté figure 1.4.

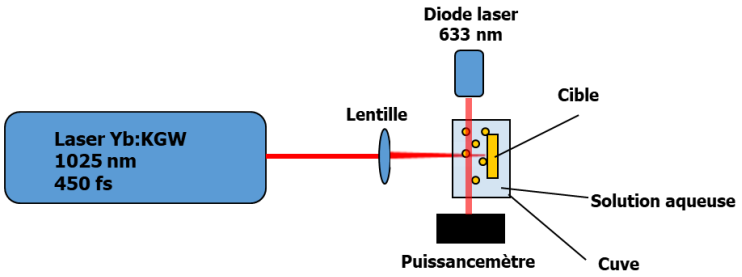

Figure 1.4 : Schéma d'une expérience d'ablation avec l'ajout de la mesure de puissance transmise pour caractériser le processus d'ablation.

L'objectif n'est pas ici de remonter à une mesure quantitative de la concentration en nanoparticules, mais de réaliser des mesures relatives, et de suivre les valeurs pour une expérience au cours du temps. Au début de l'expérience, la solution est vierge et la puissance transmise est donc maximale, puis au fur et à mesure de l'augmentation de la production de nanoparticules, cette puissance diminue, jusqu'à atteindre une valeur seuil minimale proche de 0, correspondant à une puissance transmise nulle (la solution a absorbé / diffusé l'ensemble du rayonnement). Il est à noter que pour avoir des mesures fiables, il est nécessaire d'obturer le faisceau du laser d'ablation, et d'attendre

quelques secondes (une ou deux) que la solution soit homogène avant de faire la mesure. Ces courbes d'évolution de l'intensité transmise au cours du temps ont toutes la même allure, en accord avec la loi de Beer-Lambert. Mais suivant les conditions expérimentales, la vitesse de décroissance n'est pas la même et la valeur seuil est atteinte plus ou moins rapidement. C'est l'analyse de ce comportement qui nous permet de tirer des informations sur l'efficacité de production de nanoparticules, et donc sur les meilleurs paramètres expérimentaux pour réaliser l'ablation. A titre d'illustration, la figure 1.5 rapporte les mesures réalisées avec un échantillon de silicium pour différentes distances entre le point de focalisation du faisceau d'ablation et la cible. Dans l'expérience, la cible et la cuve sont fixes, et c'est la lentille de focalisation qui est translatée en s'éloignant de la cible pour déplacer le point de focalisation à 5, 10, 15, 30 et 45 mm en amont de la cible. Comme attendu, en éloignant ce point, l'intensité transmise diminue moins vite, ce qui signifie une efficacité d'ablation moindre.

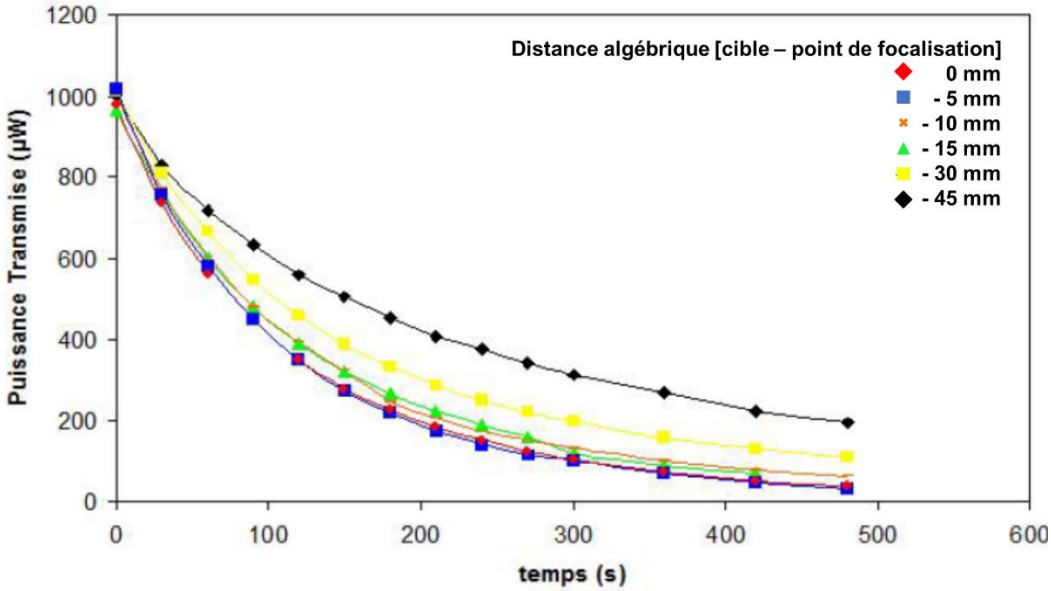

Figure 1.5 : Mesure de l'évolution de la puissance transmise en fonction du temps au cours d'une expérience d'ablation.

Au cours de ces travaux, différents matériaux ont été utilisés : des métaux ou métalloïdes (titane, or, argent, silicium), des lanthanides (europium), des matrices plus complexes (saphir dopé avec des ions titane). Les nanoparticules produites ont été analysées avec des moyens de caractérisation variés : microscopie électronique à balayage, microscopie électronique en transmission, microscopie à force atomique, diffusion dynamique de la lumière (DLS), diffraction X, spectrométrie d'absorption et d'émission. Nous ne pouvons rapporter ici l'ensemble de ces études.

Nous avons choisi d'illustrer l'influence de l'énergie par impulsion sur la taille et la morphologie des nanoparticules d'or. Ces nanoparticules ont été obtenues en deux étapes : tout d'abord une ablation d'une cible solide d'or pur, puis une fragmentation des colloïdes obtenus. Toutes les expériences rapportées ici ont été réalisées avec le laser S-pulse.
Pour l'ablation, nous avons utilisé la longueur d'onde fondamentale du laser à 1 025 nm. Pour obtenir une production optimale, nous avons réglé l'amplificateur à une fréquence de 1 kHz pour obtenir des impulsions d'énergie 120 µJ. Avec le doublet de focale 75 mm, la densité d'énergie (ou fluence) obtenue au point de focalisation est de 15 J/cm². Dans ces conditions, nous obtenons une vitesse de production de 15,6 µg/min, comparable aux 13,2 µg/min obtenus également en régime fs à 1 kHz, mais à 800 nm par [Barcikowski 2007]. On peut également calculer une efficacité en ramenant cette masse de nanoparticules produites à l'énergie laser utilisée : dans notre cas, le laser délivre une énergie de 7,2 J par minute, ce qui donne une efficacité de 2,17 µg/J. Ce rendement est supérieur aux valeurs rapportées dans la littérature dans des régimes d'impulsions plus longues : 1,5

µg/J en régime ps [Barcikowski 2007] et 0,9 µg/J en régime ns [Nichols 2006]. Ces meilleures efficacités sont typiques de l'ablation laser en régime fs, régime dans lequel des intensités crêtes sont 2 à 3 ordres de grandeur plus importantes que pour les régimes ps ou ns. De plus, vues les échelles de temps, les impulsions fs n'interagissent pas avec le plasma généré, ce qui évite qu'elles soient absorbées ou diffusées.
La caractérisation morphologique des particules est réalisée à l'aide d'un microscope électronique en transmission (MET) JEOL JEM 3010, fonctionnant à 300 kV. La figure 1.6 présente une photographie de la solution obtenue dans ces conditions, une microphotographie de l'échantillon obtenue au MET, et la répartition en taille des nanoparticules obtenues. Ce diagramme laisse apparaitre deux populations, avec des tailles moyennes autour de 7 nm et 29 nm. Une telle distribution en taille bimodale est caractéristique de l'ablation laser en régime ultracourt à des fluences intermédiaires (typiquement entre 10 et 200 J/cm²), et s'explique par les différents mécanismes en compétition. En quelques mots, on peut considérer que pour les densités d'énergie faibles, l'ablation est essentiellement due à une photo-ionisation directe, alors que pour des densités d'énergie plus importantes, on observe au niveau des cratères d'ablation la présence de matériau fondu et des traces d'effets thermiques. Dans ces dernières conditions, la fusion et l'évaporation de matière, ainsi que l'agrégation de particules expliquent l'apparition de particules de plus grosse taille [Kabashin 2003].

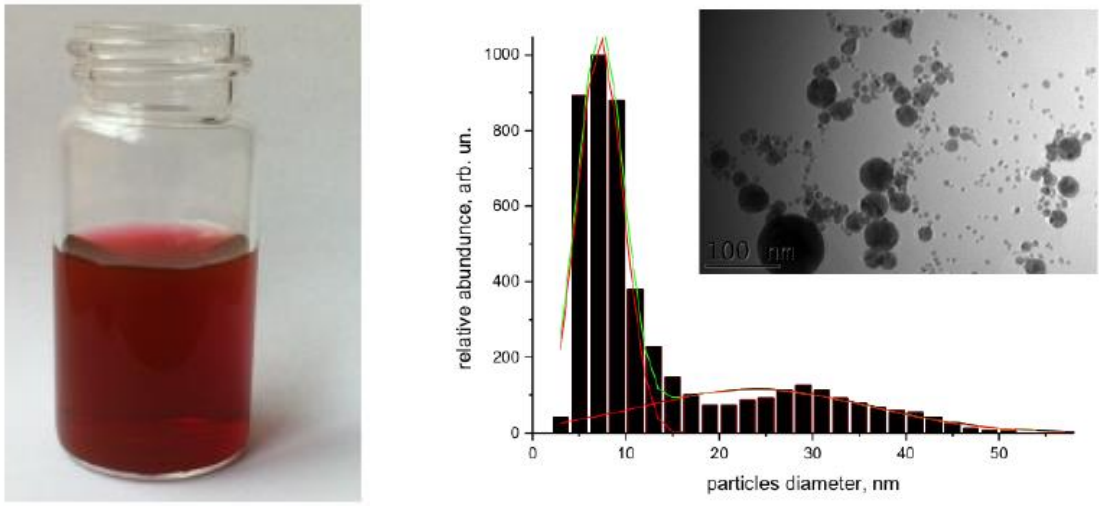

Figure 1.6 : A gauche : photographie de la solution obtenue par ablation laser d'une cible d'or. A droite : microphotographie obtenue au MET de l'échantillon, et distribution en taille des nanoparticules.

La solution de nanoparticules obtenue lors de cette première étape a ensuite été utilisée pour la fragmentation. En jouant sur le couple lame demi-onde polariseur, l'énergie par impulsion a été ajustée entre 5 et 120 µJ/impulsion, en conservant tous les autres paramètres expérimentaux identiques. Avec les mêmes conditions de focalisation, ces énergies correspondent à des fluences entre 0,63 et 15 J/cm². Des images MET représentatives des nanoparticules après fragmentation à différents niveaux d'énergie (11,5, 55, 85, 109 µJ/impulsion) sont rapportées figure 1.7. Pour les énergies faibles, inférieures à 65 µJ, le diamètre des particules est dans la gamme 7-10 nm, et l'écart type n'excède pas 70% de la taille moyenne. Comme l'illustre les images MET (figure 1.7 A et B), les nanoparticules ont une forme sphérique régulière. L'augmentation de l'énergie des impulsions au-delà de 70 µJ provoque une augmentation de la taille des nanoparticules jusqu'à 40-50 nm, avec une dispersion en taille autour de 40-60 % (figure 1.7 C). Pour des valeurs d'énergie encore plus élevées, au-delà de 85 µJ, la taille des particules diminue jusqu'à 20-25 nm, et la dispersion en taille n'excède pas 70% (figure 1.7 D). De plus, la fragmentation à des énergies laser élevées influence la morphologie des nanoparticules. Les nanoparticules résultantes sont de formes irrégulières ; elles sont reliées entre elles par les nanofils, formant des nanoréseaux d'or (figure 1.7 D).

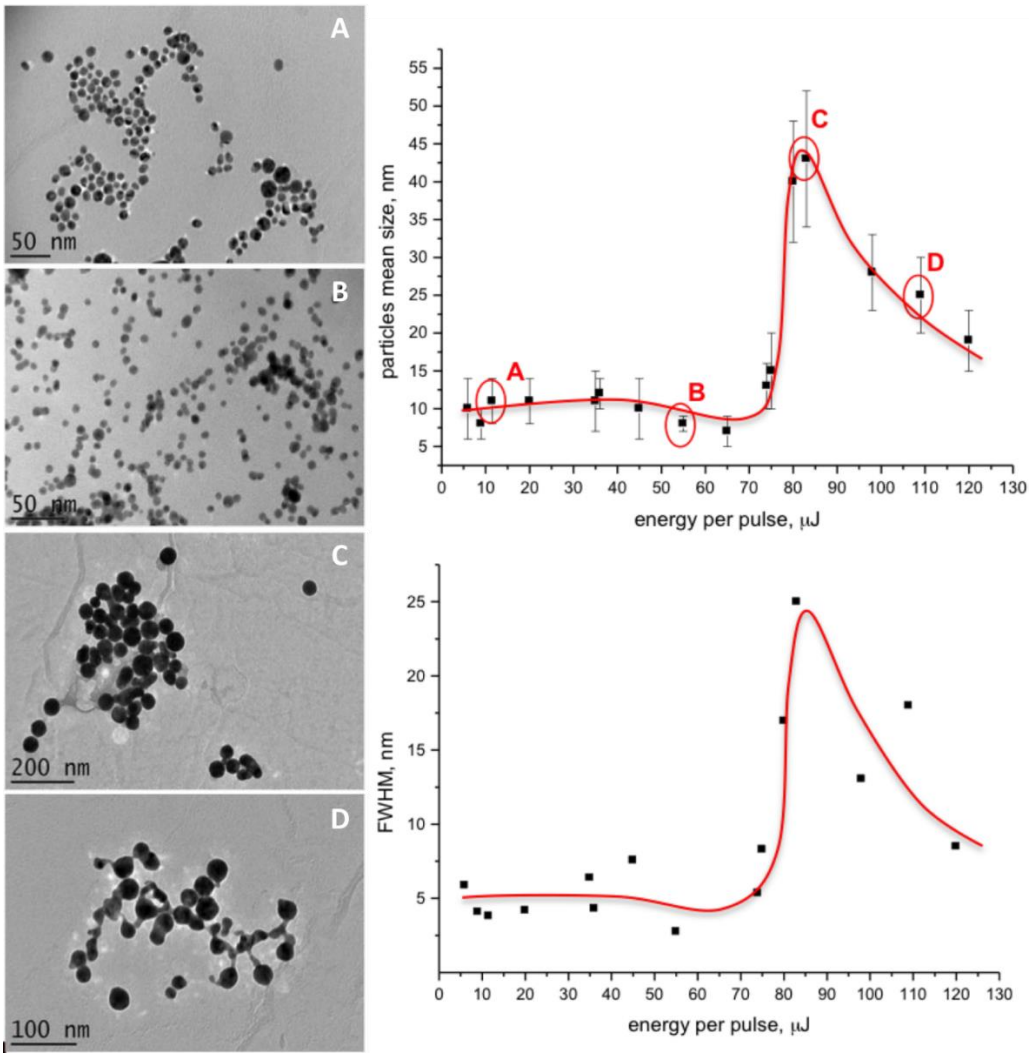

Figure 1.7 : A gauche : imagerie MET des nanoparticules d'or obtenues par fragmentation laser pour des énergies par impulsion de 11,5 (A), 55 (B), 85 (C) et 109 (D) µJ/impulsion. A droite : taille moyenne (en haut) et écart type correspondant (en bas) des nanoparticules en fonction de l'énergie par impulsion.

Les courbes de la figure 1.7 rapportent l'ensemble des mesures de taille et d'écart type réalisées pour 16 valeurs de fluence. Ces courbes mettent en évidence trois régimes de fragmentation. Pour des énergies inférieures à 80 µJ, la fragmentation se produit uniquement grâce à l'interaction directe des nanoparticules avec la lumière blanche du supercontinuum. En effet la propagation d'une impulsion laser dans l'eau s'accompagne souvent de la génération d'un supercontinuum, et avec nos impulsions de 450 fs, ce supercontinuum apparait systématiquement. L'élargissement du spectre favorise l'absorption d'énergie par les nanoparticules, notamment dans la bande 520-530 nm qui correspond au pic d'absorption du aux plasmons pour les nanoparticules d'or. Une centaine de ps après l'arrivée de l'impulsion, le mécanisme d'explosion Coulombienne induit la fragmentation, qui est suivie par une re-nucléation des nanoagrégats dans le milieu de réaction. Lorsque l'énergie par impulsion augmente, des bulles de cavitation apparaissent, et dans nos conditions expérimentales ce phénomène est maximal autour de 85 µJ. Ces bulles jouent un rôle important en piégeant les nanoparticules, ce qui initie une seconde nucléation. Des agrégats de taille plus importante sont alors créés. Enfin, pour des énergies supérieures à 90 µJ/ impulsion, la taille des nanoparticules diminue, et ces dernières s'assemblent en nanofils ou nanoréseaux (figure 1.7D). Ce type de structures est caractéristique de phénomènes thermiques (émission de petits fragments, et agrégation de particules excitées thermiquement).
On peut remarquer que la taille moyenne et l'écart type sur ces tailles suivent la même tendance, avec des dispersions en taille qui ne dépassent pas 70% sur la gamme d'énergie étudiée. Cette faible

dispersion en taille semble être l'un des avantages de la fragmentation laser femtoseconde par rapport à la plupart des autres voies de synthèse chimique ou par ablation laser (sans fragmentation, ou avec des impulsions plus longues). De plus, à travers les trois régimes de fragmentation mis en évidence, on peut contrôler les caractéristiques en taille en faisant varier uniquement un paramètre purement physique : l'énergie.

J'ai rapporté dans cette partie mes contributions sur le banc de production de nanoparticules, et un exemple d'étude réalisée sur l'influence de l'énergie sur la morphologie des particules d'or produites. Ces activités sur la production de nanoparticules par ablation laser sont toujours menées par A. KABASHIN et son équipe actuelle, comme illustré par ces publications récentes : [Nirwan 2021] [Maldonado 2020]. Les expériences auxquelles j'ai participé ont permis d'aller plus loin dans la compréhension des mécanismes à l'origine des nanoparticules. Par ces travaux, j'ai apporté ma contribution à l'obtention d'un procédé de production de nanoparticules fiable, maitrisé qui trouve des applications variées dans le domaine de la biologie et de la santé. Un exemple récent est l'utilisation de nanoparticules de nitrure de titane produites par ablation laser dans de l'acétone pour fonctionnaliser des nanofibres de polycaprolactone pour l'ingénierie tissulaire [Nirwan 2021]. Une photographie obtenue par microscopie électronique à balayage de nanofibres fonctionnalisées est rapportée figure 1.8. L'ajout de nanoparticules sur les nanofibres élargit les fonctionnalités des nanofibres : les nanoparticules permettent d'améliorer l'uniformité et la stabilité des nanofibres, leurs propriétés thermiques, tout en conservant une bonne biocompatibilité.

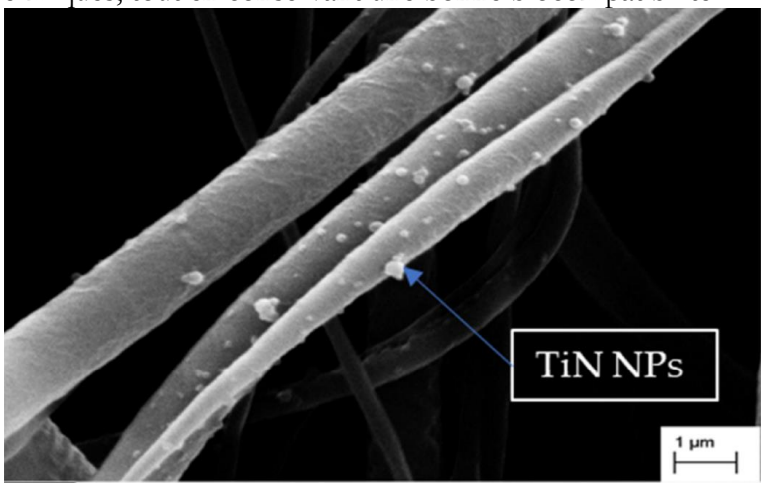

Figure 1.8 : Photographie par microscope électronique à balayage de nanofibres de polycaprolactone fonctionnalisées avec des nanoparticules de nitrure de titane. Image extraite de la publication [Nirwan 2021].

I.4 - Encadrement

Aurélie GRAVIER (stagiaire niveau M1 - 2011) et Stéphanie RENOUX (stagiaire niveau L3 - 2012, ont travaillé sur le montage expérimental permettant l'ablation laser sur cible, et le pilotage des platines de translation. Adrien STOLIDI (stagiaire niveau L3 - 2011) a mis en place la mesure de puissance laser transmise à travers la cuve pour suivre le rendement. Charlotte BOUKANDOU MOMBO (stagiaire niveau M1 – 2012) a travaillé sur la production de nanoparticules de lanthanides et leur caractérisation. Enfin, j'ai travaillé avec Ksenia MAXIMOVA (doctorante 2011 – 2014) sur différentes expériences de production de nanoparticules par ablation et par fragmentation avec les sources lasers.

I.5 - Publications et communications

LISTE DES PUBLICATIONS
Articles publiés dans des revues avec comité de lecture

[A8] KUBILIUTE R., MAXIMOVA K., LAJEVARDIPOUR A., YONG J., HARTLEY J.S., MOHSIN A.S., BLANDIN P., CHON J.W., SENTIS M., STODDART P.R., KABASHIN A., ROTOMSKIS R., CLAYTON A.H., JUODKAZIS S., "Ultra-pure, water-dispersed Au nanoparticles produced by femtosecond laser ablation and fragmentation", *International Journal of Nanomedicine* **8**, p 2601-2611 (2013)
DOI: 10.2147/IJN.S44163

[A7] BLANDIN P., MAXIMOVA K.A., GONGALSKY M.B., SANCHEZ-ROYO J.F., CHIROVNY V.S., SENTIS M., TIMOSHENKO V.Y., KABASHIN A.V., "Femtosecond laser fragmentation from water-dispersed microcolloids toward fast controllable growth of ultrapure Si-based nanomaterials for biological applications", *Journal of Materials Chemistry B* **1**, p 2489-2495 (2013)
DOI: 10.1039/c3tb20285b

[A6] KABASHIN A.V., SARNET T., GROJO D., DELAPORTE P., CHARMASSON L., BLANDIN P., TORRES R, DERRIEN T.J.Y., SENTIS M., "Laser-ablative nanostructuring of surfaces", *International Journal of Nanotechnology* **9**, issue 3-7, p 230-245 (2012)
DOI: 10.1504/IJNT.2012.045329

LISTE DES PUBLICATIONS
Articles publiés dans des proceedings ou des revues sans comité de lecture

[P9] KABASHIN A.V., GROJO D., SARNET T., DELAPORTE P., BLANDIN P., CHARMASSON L., TORRES R., DERRIEN T., SENTIS M., "Nanofabrication with pulsed lasers", *2011 Conference on Lasers and Electro-Optics Europe and 12th European Quantum Electronics Conference (CLEO EUROPE/EQEC)X*, pp. 1-1 (2011)
DOI: 10.1109/CLEOE.2011.5943339

COMMUNICATIONS A DES CONGRES

[CI4] MAXIMOVA K., ARISTOV A., GROJO D., DELAPORTE Ph., BLANDIN P., KRAVETS V., SENTIS M., GRIGORENKO A.N., KABASHIN A.V., "Engineering plasmonic nano- and metamaterials for ultrasensitive biosensing and imaging", *4th International Conference on Metamaterials, Photonic Crystals and Plasmonics (META'13)*, Charjah, Emirats Arabes Unis, Mars 2013.

[CI3] SENTIS M., BLANDIN P., DELAPORTE Ph., GROJO D., KABASHIN A.V., SARNET Th., SANNER N., UTEZA O., "Pulsed laser processing at nanoscale and applications", *7th International Conference on Surfaces, Coatings and Nanostructured Materials (NANOSMAT)*, Prague, République Tchèque, Septembre 2012

[CI1] KABASHIN A.V., DELAPORTE Ph., GROJO D., PEREIRA A., BLANDIN P., SARNET Th., SENTIS M., "Laser Ablative Nanofabrication", *Second International Worshop on Advanced, Nano- and Biomaterials and Their Applications*, Sibiu, Roumanie, Septembre 2010

[CP10] MAXIMOVA K., CORREARD F., ESTEVE M.A., BLANDIN P., ROY M., GINGRAS M., SENTIS M., BRAGUER D., KABASHIN A.V., "Synthesis of inorganic nanomaterials by ultrashort laser ablation in liquids", *E-MRS Spring Meeting,* Strasbourg, France, Mai 2013
Prix de la meilleure présentation poster obtenu par K. MAXIMOVA

[CP9] KABASHIN A.V., GROJO D., SARNET T., DELAPORTE P., BLANDIN P., CHARMASSON L., TORRES R., DERRIEN T., SENTIS M., "Nanofabrication with pulsed lasers", *Conference on Laser and Electro-Optic Europe (CLEO Europe)*, Munich, Allemagne, Mai 2011

[CP8] KABASHIN A.V., DELAPORTE Ph., GROJO D., PEREIRA A., BLANDIN P., SARNET Th., SENTIS M., "Laser ablative nanofabrication", *International Conference on Advanced Laser Technologie (ICONO-LAT),* Kazan, Russie, Aout 2010

[CA13] MAXIMOVA K., BLANDIN P., SENTIS M., KABASHIN A.V., "Femtosecond laser fragmentation for synthesis of ultrapure nanomaterials for biological applications", *International Conference on Laser Ablation*, Ischia, Italie, Octobre 2013.

[CA12] MAXIMOVA K., BLANDIN P., KABASHIN A., « Synthesis of novel nanomaterials by ultrashort laser ablation in liquids », *MifoBio 2012*, Talmont Saint Hilaire, France, Octobre 2012

[CA8] KABASHIN A.V., DELAPORTE Ph., GROJO D., PEREIRA A., BLANDIN P., SARNET Th., SENTIS M., "Nanofabrication with Pulsed Lasers", *International Conference on Nanophotonics*, Tsukuba, Japon, Juin 2010

II - Un laser térawatt pour créer une source X pour l'imagerie par contraste de phase

II.1 - Introduction et objectif des travaux

Comme on a commencé à le voir dans le paragraphe précédent, l'interaction entre une impulsion laser intense et un matériau engendre des processus physiques uniques, qui permettent de modifier la matière. Et ce sont les propriétés de l'impulsion (énergie, durée, intensité…) qui dictent ces phénomènes. Grâce aux lasers impulsionnels, des intensités très élevées peuvent être obtenues en utilisant des impulsions ultracourtes, fs, qui concentrent l'énergie sur une durée extrêmement brève. Lorsque le rayonnement atteint de telles intensités très élevées (c'est-à-dire des valeurs d'éclairement crête, plus communément appelé par abus de langage « intensité crête », supérieure à 10^{16} W/cm²), le régime d'interaction est particulier, à la frontière entre la physique relativiste et la physique non relativiste.
En effet, le point de départ de la physique de l'interaction laser – matière est la dynamique de l'électron dans le champ laser. Le mouvement de l'électron dans un champ électromagnétique $(\vec{E}, \vec{B})$ est régi par l'équation de Lorentz :

$$m_e \frac{d\overrightarrow{v_e}}{dt} = -e\left(\vec{E} + \overrightarrow{v_e} \times \vec{B}\right)$$

où e, m_e, et $\overrightarrow{v_e}$ sont respectivement la charge, la masse et la vitesse de l'électron. Deux régimes d'intensité sont définis à partir de l'équation du mouvement de l'électron : le régime non-relativiste où la composante $\overrightarrow{v_e} \times \vec{B}$ est négligeable, et le régime relativiste lorsque la vitesse de l'électron devient non négligeable par rapport à la vitesse de la lumière. Dans ce dernier cas, la composante $\overrightarrow{v_e} \times \vec{B}$ doit être prise en compte dans l'équation du mouvement de l'électron. Cette frontière entre régime relativiste et non relativiste dépend de l'amplitude laser normalisée a_0, qui s'exprime en fonction de l'amplitude du champ électrique du laser E_0 par : $a_0 = \frac{eE_0}{m_e \omega c}$, avec ω la pulsation de l'onde laser. On peut écrire a_0 sous la forme $a_0 = 0{,}85 \times \sqrt{I_{18}\lambda_{\mu m}^2}$, où I_{18} est l'intensité laser par

unité de 10^{18} W/cm² et $\lambda_{\mu m}$ la longueur d'onde laser exprimée en μm. Le seuil du régime relativiste est défini pour $a_0 = 1$, ce qui correspond à une intensité laser I :

$$I = \frac{1}{\lambda_{\mu m}^2} \times 1{,}38 \times 10^{18}\ W/cm^2$$

Les lasers Titane Saphir, c'est-à-dire les lasers utilisant comme milieu amplificateur une matrice de saphir dopée avec des ions titane, sont des sources souvent utilisées sur les chaines laser de puissance. Elles émettent à une longueur d'onde autour de 800 nm. La plateforme ASUR utilisée pour ces travaux, et que nous allons présenter plus en détails dans la suite, est basée sur ces technologies matures. A ces longueurs d'onde, le régime relativiste est atteint à partir d'une intensité $I \approx 2{,}15 \times 10^{18}\ W/cm^2$. ASUR permet de couvrir une gamme d'intensités entre $10^{16}\ W/cm^2$ et $10^{19}\ W/cm^2$. Ainsi, grâce à cette source, tout un pan de la physique de l'interaction à la frontière entre deux modèles, et par conséquent mal appréhendé, va pouvoir être exploré expérimentalement. Les travaux auxquels j'ai participé se sont concentrés plus précisément sur la génération de rayons X, de type K_α, par interaction laser matière.

Les propriétés de ce type de sources X sont originales et sont étroitement liées aux mécanismes qui en sont à l'origine. Ces sources ont une faible extension spatiale et un spectre fin, ce qui leur confère des propriétés de cohérence remarquables. De plus les rayons X sont générés sous forme d'impulsions ultracourtes. Ces propriétés sont très intéressantes notamment en physique fondamentale pour sonder la matière [Siders 1999], [Sokolowski-Tinten 2001], [Dorchies 2008].

Les propriétés de cohérence d'une telle source permettent de faire de l'imagerie X dite « par contraste de phase ». Comme aux longueurs d'ondes optiques classiques, l'échantillon, caractérisé par un indice de réfraction complexe, va d'une part absorber une partie du rayonnement (partie imaginaire de l'indice de réfraction), et d'autre part induire un déphasage (partie réelle de l'indice). L'imagerie par absorption est sensible aux variations d'opacité dans l'échantillon, et très efficace par exemple pour imager les os. Cette technique montre des limitations pour imager des tissus dont les coefficients d'absorption sont faibles (par exemple les tissus mous), ou des tissus possédant des absorptions similaires ou très proches (cas d'un tissu sain et malade).

Un exemple d'imagerie X de tissus mous par excellence est la mammographie. La mammographie est largement utilisée pour le dépistage du cancer du sein. En effet, après 50 ans, on note une augmentation de l'incidence des tumeurs mammaires qui peuvent être bénignes (kystes) ou malignes (carcinomes). Les tumeurs malignes peuvent être suspectées à la mammographie par la présence de microcalcifications, et plus la qualité des images sera bonne, plus tôt et plus facilement seront détectées ces microcalcifications. Pour cet examen, l'énergie de photon requise doit être relativement faible, dans la gamme [15 – 25] keV, puisque ce tissu est plus radiosensible que d'autres [Lawaczeck 2005], [Krol 1997]. Cette imagerie utilise le plus souvent un tube à rayon X au Molybdène (raies caractéristiques K_α à 17,45 keV). Les techniques traditionnelles de mammographie par absorption ont leur limite, et la mammographie par contraste de phase peut permettre de les surpasser, en augmentant le contraste des images et en réduisant la dose envoyée à la patiente [Bravin 2013].

Ainsi l'imagerie par contraste de phase permet de fournir des images avec de très forts contrastes pour des objets peu absorbants. Des dispositifs d'imagerie interférométriques permettent de révéler ces contrastes, mais dans ces gammes spectrales, les optiques ou cristaux utilisés sont relativement complexes. Une autre approche utilisant la propagation du champ après interaction avec l'échantillon, similaire à l'holographie en ligne sans bras de référence [Wilkins 1996], permet de s'affranchir des composants « optiques », mais nécessite une cohérence spatiale importante. Les sources X K_α générées par laser ont les propriétés de cohérence, compatibles avec cette modalité d'imagerie « sans lentille » [Fourmaux 2011], [Wenz 2015].

L'objectif des travaux est de maitriser l'interaction pour créer une source X contrôlée et de l'appliquer à l'imagerie médicale, et plus précisément à la mammographie.

II.2 - Cadre des travaux et collaborations

L'ensemble des travaux présentés dans cette partie ont été réalisés au LP3 entre 2011 et 2014, dans le cadre d'ASUR : Plateforme d'Applications des Sources laser Ultra-Rapides pour l'imagerie X et l'interaction laser-matière. Le projet ASUR, visant à installer à Marseille un laser ultra-rapide intense de forte puissance moyenne, et à l'utiliser pour étudier son interaction avec différents matériaux et pour développer des procédés, a été inité en 2008. Cette initiative s'inscrivait dans le cadre d'une coopération entre le laboratoire LP3 (Marc SENTIS) et l'Université de La Méditerranée de Marseille d'une part, et le Laboratoire interaction laser-matière à haute intensité et applications (Jean-Claude KIEFFER) et l'Institut National de La Recherche Scientifique de Québec d'autre part. ASUR a été financée par l'Union Européenne, le Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche, la Région Provence-Alpes-Côte d'Azur, le Conseil Général des Bouches-du-Rhône, la Ville de Marseille, le CNRS, l'Université de la Méditerranée et le Pôle de Compétitivité Optitec. Différentes activités sont menées sur ASUR, et j'ai pour ma part participé à l'activité « Sources secondaires (Rayons X) : génération, caractérisation », sous la responsabilité scientifique de Marc SENTIS, Olivier UTEZA et Vadim TCHEREMISKINE. En lien avec cette activité, j'avais en charge le projet « Imagerie pour la santé », qui a été construit en liaison avec le Centre Européen de Recherche en Imagerie MEDicale (CERIMED) de Marseille. J'ai également pu participer à des campagnes d'expériences de l'activité « Endommagement ≤ 25 fs », dirigée par O. UTEZA, en collaboration avec des scientifiques chinois du NINT (Northwest Institute of Nuclear Technology, Xian).
Une telle plateforme est une infrastructure lourde, et les aménagements du bâtiment nécessaires ainsi que l'installation de la source ont pris du temps. La livraison de la ligne haute puissance permettant la génération de rayons X a été finalisée à l'été 2012. J'ai donc participé à la conception du banc expérimental permettant la mise en forme spatiale des impulsions en sortie de la chaine laser, et leur interaction avec une cible solide. Avant mon départ à l'été 2014, j'ai également travaillé avec l'ensemble de l'équipe à la prise en main de la chaine laser, et à l'installation des premiers bancs optiques et équipements scientifiques. J'ai participé aux premières expériences de mise en forme du faisceau et d'interaction avec des cibles à bas flux. Les premiers rayons X ont été obtenus après mon départ. Pour la partie imagerie X, j'ai réalisé un travail de bibliographie et fait des études de dimensionnement pour initier ces nouvelles activités pour le laboratoire et préparer les travaux sur le contraste de phase.

II.3 - Principaux résultats

Pour commencer, intéressons-nous rapidement aux mécanismes à l'origine du rayonnement X. Comme dans la partie précédente, l'objectif n'est pas ici de rentrer dans le détail des mécanismes d'absorption de l'énergie laser par la cible, mécanismes qui sont multiples et complexes. Nous allons tenter de rapporter les éléments permettant d'appréhender les mécanismes essentiels.
Le régime d'interaction ultra-intense et ultra-court est caractérisé par deux aspects fondamentaux : d'une part l'amplitude du champ électrique associé à l'onde laser est supérieure au champ coulombien qui relie les électrons aux atomes, et d'autre part la durée de l'impulsion (fs) est bien inférieure aux temps caractéristiques de l'expansion hydrodynamique d'un plasma ainsi que celui

des collisions électron – ion. Pour fixer les ordres de grandeur, le champ électrique associé à un rayonnement laser possédant un éclairement de 10^{19} W/cm² prend des valeurs autour de 8.10^{12} V/m, supérieures au champ coulombien estimé à 5.10^{11} V/m. Aussi lorsqu'une impulsion laser femtoseconde ultra-intense interagit avec un solide, un plasma surfacique est produit. Ce plasma est caractérisé par une densité électronique élevée, typiquement 10^{21} cm^{-3} pour une impulsion bien propre, c'est-à-dire possédant un profil temporel régulier et sans rebond (pour un solide cette densité est autour de 5.10^{22} cm^{-3} - 10^{23} cm^{-3}). Les électrons du plasma accélérés dans le champ laser acquièrent une fraction de l'énergie laser via différents mécanismes d'absorption. Dans notre cas, les mécanismes d'absorption sont principalement non collisionnels. Il s'agit essentiellement de l'effet Brunel [Brunel 1987], de l'absorption résonante [Kruer 2003], et du chauffage pondéromoteur $J \times B$ [Kruer 1985]. A l'issue de cette interaction, deux populations électroniques sont générées : des électrons dits thermiques du plasma dont la température est de l'ordre de 0,1 - 1 keV, et des électrons chauds dont la température est de l'ordre de 10 – 100 keV. Ces électrons chauds énergétiques sont accélérés vers la cible froide et engendrent l'ionisation de la couche la plus profonde de l'atome, la couche K. Afin de combler les lacunes créées, des électrons de la couche supérieure L se désexcitent vers la couche K. Cette désexcitation s'accompagne d'une émission de photons caractéristiques K_α. Le spectre de la source X induite est composé de raies K_α spécifiques du matériau de la cible, et d'un continuum dû à l'émission du rayonnement de freinage : le Bremsstrahlung.
Une telle source K_α possède ainsi des propriétés uniques. Temporellement, la durée d'émission peut aller de quelques picosecondes jusqu'à 100 fs suivant les conditions de l'interaction. Une telle durée est un atout majeur pour l'étude des phénomènes ultra-rapides de la matière condensée. Spectralement, l'émission est quasi-monochromatique, concentrée sur l'énergie de la transition électronique entre les couches K et L du matériau de la cible. Une « accordabilité » sur la gamme 1-100 keV peut être obtenue en modifiant le matériau de la cible. Spatialement, l'extension de cette source est faible, et reliée au volume d'interaction entre le faisceau laser focalisé et la cible. Des tailles de sources de quelques μm peuvent ainsi être atteintes, typiquement entre 5 et 50 μm de diamètre pour des conditions d'interaction comme celles obtenues avec ASUR. Ces deux derniers points confèrent à la source des propriétés de cohérence compatibles avec l'imagerie de contraste de phase sans lentille.

L'imagerie de phase apparaît particulièrement adaptée pour les matériaux possédant un numéro atomique faible. En effet, pour ces matériaux, la composante réelle de l'indice optique qui représente le déphasage est en moyenne 100 fois plus importante que la composante imaginaire représentant l'absorption pour des énergies autour de la dizaine de keV. Si on regarde précisément le cas de l'eau, ce rapport entre la partie réelle et la partie imaginaire vaut $9{,}7.10^2$ pour des photons X d'énergie 20 keV [Momose 2005]. Ainsi l'imagerie de phase permet d'amener de nouvelles informations dans une exploitation médicale, notamment pour l'imagerie de tissus mous dans des plages d'énergie de rayons X de quelques dizaines de keV. Cette modalité permet d'envisager d'augmenter le contraste entre deux types de tissus, d'augmenter la sensibilité, ou encore d'utiliser de manière plus efficace la dose de rayonnement à laquelle est exposé le tissu, en comparaison des techniques classiques d'imagerie par absorption. Jusqu'aux années 2000, l'imagerie de phase utilisait essentiellement comme sources des grands instruments tels que les synchrotrons. Ces sources présentent une forte luminance (puissance rayonnée par unité de surface et par unité d'angle solide), et une grande cohérence, mais leur taille et leur coût limitent leur développement pour ces applications. Des sources plus compactes possédant les propriétés de cohérence nécessaires ont été développées, mais elles possèdent des limitations en terme de performances : les tubes X à microfocale possèdent une cohérence spatiale suffisante, mais une relativement faible luminance, et les sources « X pinch » micrométriques [Beg 2003] émettent à faible cadence (typiquement 1 tir toutes les dix minutes) avec une faible luminance. Les sources X générées par laser, de par leur relative compacité, leur forte luminance, semblent un compromis intéressant, avec des

caractéristiques de rayonnement qui s'approchent de celles du synchrotron, mais avec un encombrement proche des sources miniaturisées.
L'imagerie X par contraste de phase, et plus particulièrement la mammographie, est l'application phare visée pour la source K_α. Cette activité étant complètement nouvelle pour le laboratoire, un travail conséquent de bibliographie et de dimensionnement a dû être réalisé. Dans ce cadre, des calculs du contraste de l'image sur des objets modèles simples ont été réalisés, basés sur les caractéristiques nominales du rayonnement de la plateforme ASUR, et sur les performances visées pour la source de rayonnement X. Ces simulations nous ont permis de commencer à appréhender cette technique d'imagerie sans lentille et les paramètres importants (taille de la source, distance source – détecteur…). Dans la même idée, des calculs de la dose à laquelle un échantillon est exposé pour réaliser une image avec un contraste satisfaisant ont été faits. Il s'agissait de vérifier, en considérant les problématiques liées à la radioprotection, qu'on se situait à des niveaux inférieurs aux limites réglementaires pour une mammographie. Ces travaux numériques préliminaires, point de départ des activités sur l'imagerie X au laboratoire, étaient indispensables pour monter en compétences sur le sujet. Ils nous ont permis de poser des premiers jalons et de commencer à construire l'expertise collective de l'équipe : ces ordres de grandeurs nous ont permis de valider que la source ASUR nous permettrait d'obtenir des images par contraste de phase avec des doses raisonnables. Nous ne présenterons pas ici ces travaux.

Pour adresser cette application, le matériau choisi pour la cible est le Molybdène (Z=42), qui possède une raie caractéristique K_α à 17,45 keV. Ensuite, la source X est optimisée suivant deux directions :

- L'amélioration du rendement de production de photons K_α, ou autrement dit l'augmentation du flux de photons produits suivant la raie caractéristique, afin de maximiser le contraste des images tout en réduisant le temps d'exposition nécessaire pour le patient.
- La réduction de la taille de la source, pour améliorer la résolution des images. L'objectif est d'avoir une taille de source X proche de la dimension de la zone d'interaction, c'est-à-dire comparable à la tâche focale du faisceau laser.

Comme expliqué précédemment, le rayonnement K_α est induit par ionisation des couches internes de la cible froide par les électrons chauds. Le nombre de photons K_α émis dépend donc des caractéristiques des électrons chauds, notamment de leur distribution en énergie. La taille de la source X dépend de la propagation de ces électrons chauds en surface ou dans le volume de la cible. Or l'accélération des électrons est induite par le champ électromagnétique de l'impulsion laser, par conséquent le contrôle de la distribution des électrons chauds est essentiellement réalisé en maîtrisant les paramètres du faisceau laser. Les principaux sont l'intensité, la durée de l'impulsion, sa forme temporelle et la longueur d'onde. Aussi, expérimentalement les mises en forme spatiale et temporelle des impulsions sont fondamentales.
D'une manière intuitive, la mise en forme spatiale est essentielle pour obtenir la meilleure focalisation possible du faisceau au niveau de la cible. D'une part, c'est uniquement en concentrant l'énergie spatialement qu'on pourra atteindre les intensités crêtes extrêmes visées, entre $10^{16}\ W/cm^2$ et $10^{19}\ W/cm^2$, sur la cible. D'autre part, la taille de la source X dépendra de la taille de cette tâche focale.
La mise en forme temporelle est également primordiale. Il y a d'une part la durée des impulsions qui doit être maîtrisée pour obtenir des intensités crêtes élevées. Mais il y a un autre paramètre plus spécifique qui a une grande influence : le rapport de contraste temporel, ou plus simplement contraste temporel. La forme temporelle de l'impulsion laser femtoseconde est composée en général de l'impulsion « pic » principale femtoseconde, accompagnée d'un piédestal et/ou de pré-impulsions (figure 1.9). Le contraste temporel est défini comme le rapport de l'intensité pic de l'impulsion sur l'intensité du piédestal ou de la préimpulsion. Le piédestal peut durer jusqu'à quelques ns et il est généralement dû à l'émission spontanée amplifiée (ASE pour Amplified Spontaneous Emission) générée dans les chaines lasers. Cette émission, aléatoire, se forme à partir

du bruit de photons au sein de tous les milieux amplificateurs de la chaîne. Les préimpulsions sont quant à elles dues à des défauts intrinsèques de la chaine laser, reproductibles, liés au processus de production de l'impulsion ou à des défauts permanents de l'installation laser. On peut citer par exemple des réflexions parasites sur certains éléments optiques de la chaine laser, le contraste imparfait de certains éléments (couple cellule de Pockels / polariseur), l'orientation des cristaux amplificateurs… Le contraste temporel est primordial car il peut modifier l'état de la cible qui sera vue par l'impulsion femtoseconde lors du processus d'interaction. A forte intensité laser ($I > 10^{17} W/cm^2$), les intensités de l'ASE et des préimpulsions peuvent facilement atteindre le seuil d'ionisation du matériau de la cible (typiquement $10^{12} W/cm^2$), pour former un pré-plasma. Ce pré-plasma peut contribuer à l'accélération des électrons chauds, et ainsi éloigner des conditions énergétiques optimales pour une émission efficace des raies caractéristiques. De plus, la formation d'un pré-plasma sur la cible induit un élargissement de la taille de la source, puisque les électrons préalablement accélérés par le piédestal de l'impulsion auront probablement des trajectoires plus longues sur la surface de la cible. Ainsi, pour optimiser la source X, il est essentiel de maîtriser et d'optimiser la focalisation sur la cible, et le contraste temporel de l'impulsion.

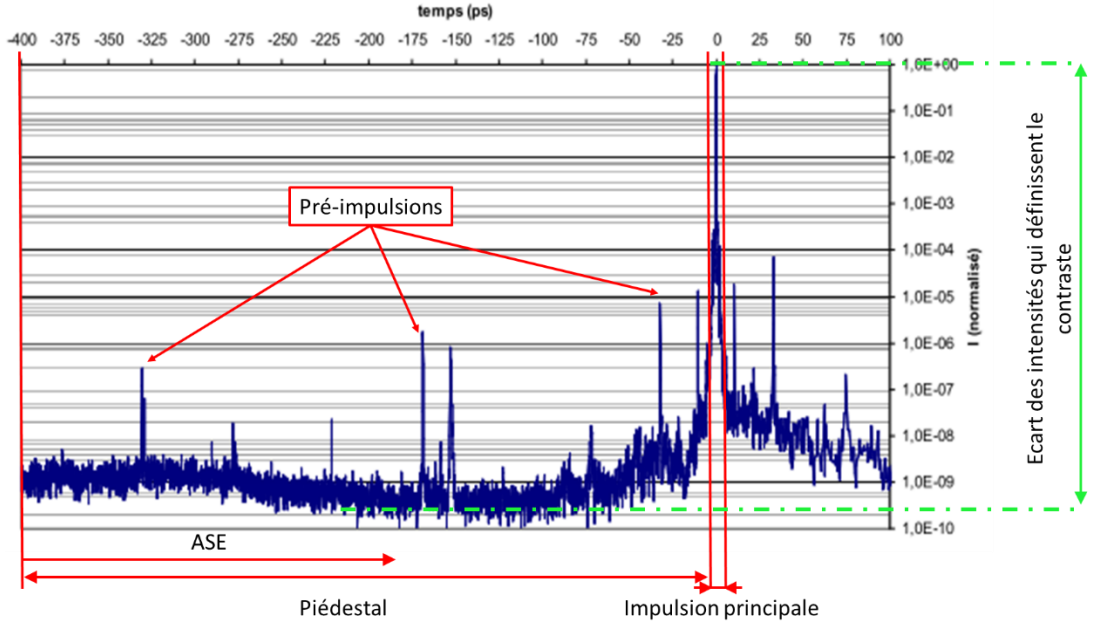

Figure 1.9 : Mesure temporelle réalisée sur la ligne 2 d'ASUR (10 TW de puissance crête à 25 W de puissance moyenne).

Intéressons-nous maintenant au montage expérimental. Le cœur de ces travaux est la plateforme ASUR, bâtie autour d'une source laser développée par la société Amplitude Technologies (Lisses, France). Ce prototype est basé sur la technologie Titane:Saphir et sur l'amplification à dérive de fréquence (ou CPA pour Chirped Pulse Amplification). L'amplification à dérive de fréquence consiste à diminuer l'intensité crête lors de l'amplification de l'impulsion laser permettant ainsi d'amplifier des impulsions jusqu'à des énergies importantes tout en limitant les risques d'endommagement des différents éléments optiques constituant la chaine amplificatrice [Strickland 1985]. Comme illustré sur la figure 1.10, grâce à des composants dispersifs (réseaux), les différentes composantes spectrales de l'impulsion ultracourte parcourent des chemins optiques différents (les longueurs d'onde plus élevées parcourent un chemin plus court). Ceci a pour effet d'étaler temporellement les impulsions, qui sont ainsi typiquement entre 10^3 et 10^5 fois plus longues. Dans ces conditions, l'intensité crête est suffisamment faible pour être introduite dans les différents milieux amplificateurs. L'impulsion amplifiée est finalement recomprimée temporellement par un procédé inverse à celui de l'étireur. Il semblait intéressant ici de prendre quelques lignes pour décrire

brièvement ce principe, qui a valu à ses inventeurs G. Mourou et D. Strickland le Prix Nobel de Physique en 2018.

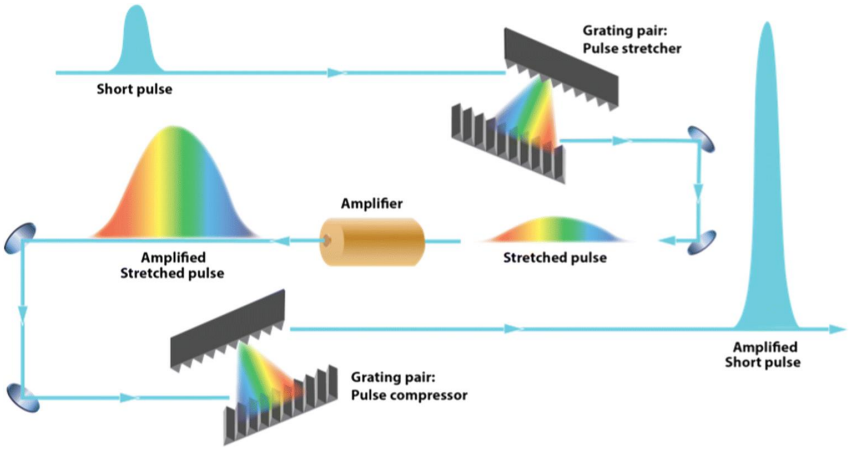

Fig 1.10 : Principe de l'amplification à dérive de fréquence [Asplund 2019].

ASUR délivre 6 faisceaux suivant quatre sorties laser principales à 800 nm (figure 1.11). Les deux lignes ultra-intenses 1 et 2 sont dédiées au développement et à l'étude de la source X. Les lignes 3 et 4 sont employées pour étudier l'interaction laser – semiconducteur. Enfin, les lignes 5a et 5b sont utilisées d'une part pour l'étude de seuils d'endommagement et d'ablation dans les matériaux diélectriques et d'autre part pour travailler sur la dynamique des électrons libres dans les matériaux diélectriques et métalliques sous excitation laser. Les caractéristiques principales de ces différentes lignes sont résumées dans le tableau 1.1. Comme l'oscillateur est commun à toutes les lignes, elles peuvent être facilement synchronisées et combinées entre elles.
Cet oscillateur délivre des impulsions femtosecondes (~10 fs) à un taux de répétition de 76 MHz, avec en sortie une énergie par impulsion de quelques nJ. En sortie d'oscillateur, un module « Booster » est utilisé. Ce module est constitué d'un amplificateur multi-passages (14 passages dans le milieu amplificateur) avec un facteur d'amplification de l'ordre de 10^4, et d'un absorbant saturable permettant de nettoyer temporellement l'impulsion en filtrant le piédestal. Un obturateur optique ultra-rapide (cellule de Pockels) est utilisé afin de réduire la cadence des impulsions. En sortie de ce module est obtenu un train d'impulsions fs à une fréquence de 100 Hz, et avec une énergie par impulsion de ~10 µJ. Les impulsions sont ensuite injectées dans un étireur à réseau, pour atteindre des durées de 500 ps. Puis, elles sont envoyées dans deux étages d'amplification : un premier étage d'amplification de type régénératif (« Regen »), puis un second étage de type multi-passages (« Pre-ampli »), pour atteindre une énergie de 6 mJ. L'ensemble de ces éléments (oscillateur, booster, étireur, regen, pre-ampli) constitue la partie commune (« Front end ») de l'ensemble des faisceaux lasers délivrés par la plateforme ASUR.
Avant de nous concentrer sur les lignes à plus haute intensité, ouvrons une courte parenthèse sur la ligne 5b, utilisée pour des expériences d'endommagement [A9], qui présente les durées d'impulsion les plus courtes (10 fs). Les impulsions brèves sont synonymes de larges bandes spectrales. En effet, pour une impulsion dite limitée par transformée de Fourier, il existe une relation entre la largeur temporelle Δt (à mi-hauteur) et la largeur spectrale $\Delta \nu$ (à mi-hauteur) des impulsions : $\Delta \nu . \Delta t \geq K$, où K est une constante dépendant de la forme des impulsions. ($K = 0{,}44$ pour une impulsion gaussienne et $K = 0{,}315$ pour une impulsion en sécante hyperbolique carrée). Dans notre cas, les impulsions ont une durée nominale de 25 fs, et une largeur spectrale de 62 nm. Ces impulsions sont raccourcies en utilisant la technique de modulation de phase croisée ou XPW (pour Cross-Polarized Wave), combinée à un dispositif optique de contrôle de la dispersion (à base de miroirs dits « chirpés »). La XPW est un processus non-linéaire du troisième ordre, qui permet d'une part d'améliorer le contraste temporel des impulsions, et d'autre part d'élargir le spectre, ce qui favorise un raccourcissement supplémentaire de la durée des impulsions [Jullien 2005][Adams

2010]. Ainsi, de telles impulsions ont à la fois des durées très courtes, mais également un profil temporel très propre, sans ASE, ce qui permet d'étudier proprement l'interaction laser matière en régime ultracourt.
Pour revenir aux lignes 1 et 2, des lames séparatrices permettent d'envoyer une partie du faisceau en sortie du « Front end » sur la ligne 1 et une autre partie sur la ligne 2. Pour la ligne 1, un obturateur optique permet de réduire la cadence des impulsions à 10 Hz, avant de les injecter dans deux étages d'amplification multi-passages pour obtenir en sortie une énergie de 500 mJ par impulsion et une puissance crête de 20 TW. Pour la ligne 2, deux étages d'amplification multi-passages permettent d'atteindre une énergie par impulsion de 250 mJ et une puissance crête de 10 TW mais à une cadence de 100 Hz. Sur les deux lignes, le contraste temporel est supérieur à 10^8 sur des durées ns et ps.

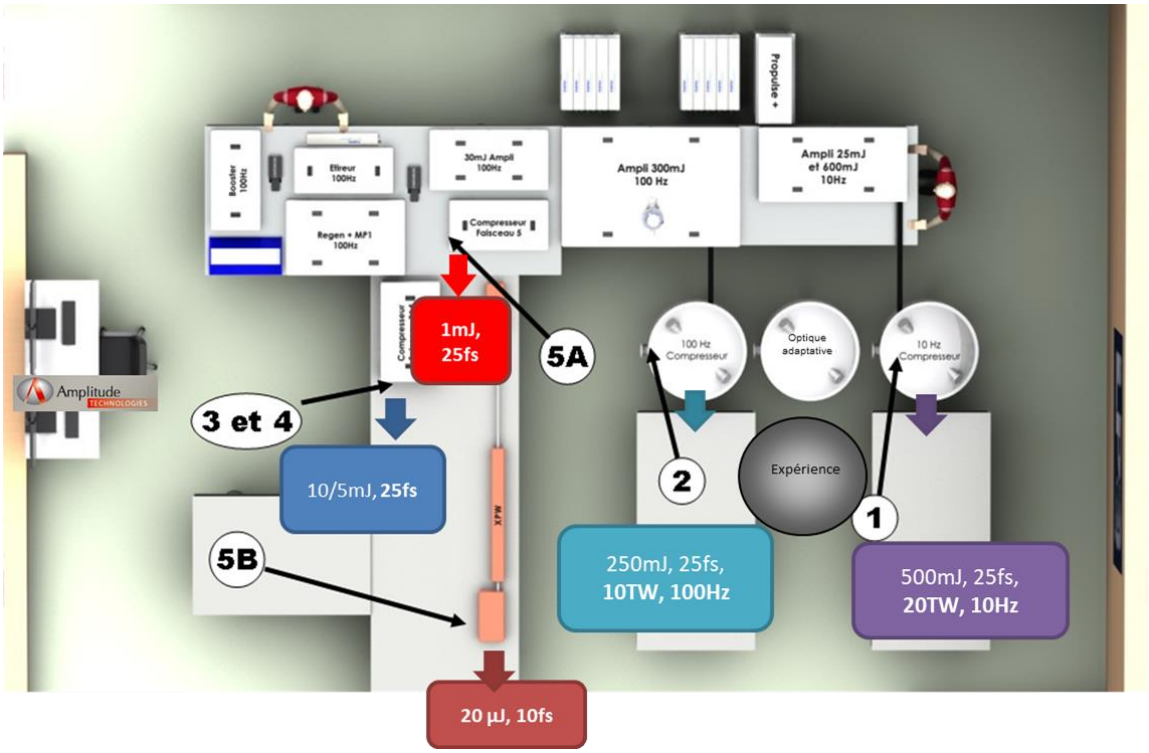

Fig 1.11 : Schéma de l'installation ASUR. Sont représentées les sorties des principaux faisceaux. Pour chacune apparaissent les principales caractéristiques.

Faisceau ASUR @ 800 nm	Durée	Energie	Cadence	Diamètre à $1/e^2$	Puissance crête	Puissance moyenne
1	25 fs	500 mJ	10 Hz	45 mm	20 TW	5 W
2	25 fs	250 mJ	100 Hz	45 mm	10 TW	25 W
3/4	25 fs	15 (10/5) mJ	100 Hz	22,5 mm	0,6 TW	1,5 W
5a	25 fs	1 mJ	100 Hz	15 mm	40 GW	1,5 W
5b	~10 fs	20 µJ	100 Hz	15 mm	2 GW	-

Tableau 1.1: Caractéristiques principales des différentes lignes de ASUR.

Les travaux reportés ici, les tout premiers pour la génération de rayons X, ont été réalisés sur la ligne 1. En effet, la montée en cadence à 100 Hz d'impulsions aussi énergétiques est un défi technique très relevé, et les étages d'amplification de la ligne 2, notamment le deuxième amplificateur multi-passages comportant 10 lasers de pompe et un refroidissement cryogénique pour le cristal, ont été les derniers à être fonctionnels.
En sortie des derniers étages d'amplification, l'impulsion est comprimée temporellement dans un compresseur sous vide (pression ~ 10^{-5} mbar). En sortie du compresseur (figure 1.12), l'impulsion

se propage sous vide jusqu'à l'enceinte d'interaction. En effet, la puissance crête des impulsions est telle qu'elles ionisent l'air, et ne peuvent par conséquent pas s'y propager. Après le compresseur, le faisceau traverse l'enceinte d'optique adaptative, qui comprend le miroir déformable pour corriger les aberrations présentes sur le front d'onde laser et permettre *in fine* une meilleure focalisation. Enfin, les impulsions terminent leur trajet dans l'enceinte d'interaction, maintenue à une pression de 10^{-4} mbar (vide secondaire). Elles sont focalisées par l'intermédiaire d'une parabole hors axe de focale 150 mm, sur la cible métallique épaisse.
Nous allons maintenant revenir sur le contrôle expérimental des deux paramètres clés de l'interaction : la mise en forme spatiale et la mise en forme temporelle des impulsions.

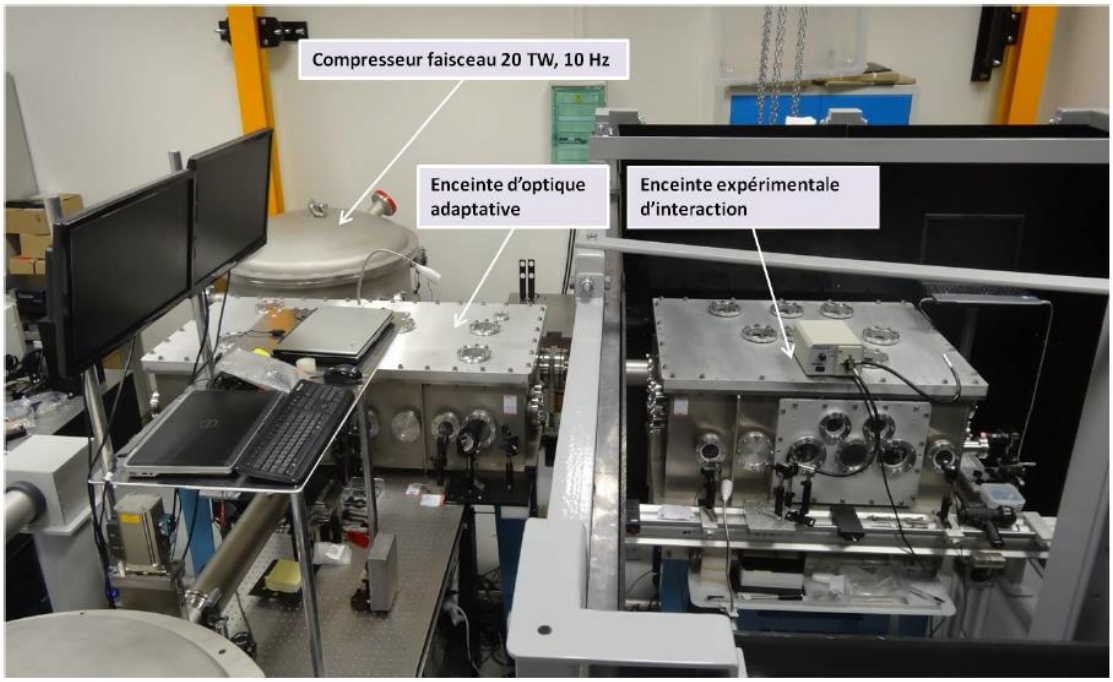

Fig 1.12 : Photographie de l'installation. Sont visibles le compresseur en fin de ligne 1, l'enceinte d'optique adaptative et l'enceinte d'interaction.

Concernant la mise en forme spatiale du faisceau, des procédures d'alignement précises, que nous n'allons pas détailler ici, ont été mises au point en sortie du compresseur. Le schéma optique des deux enceintes est rapporté figure 1.13.

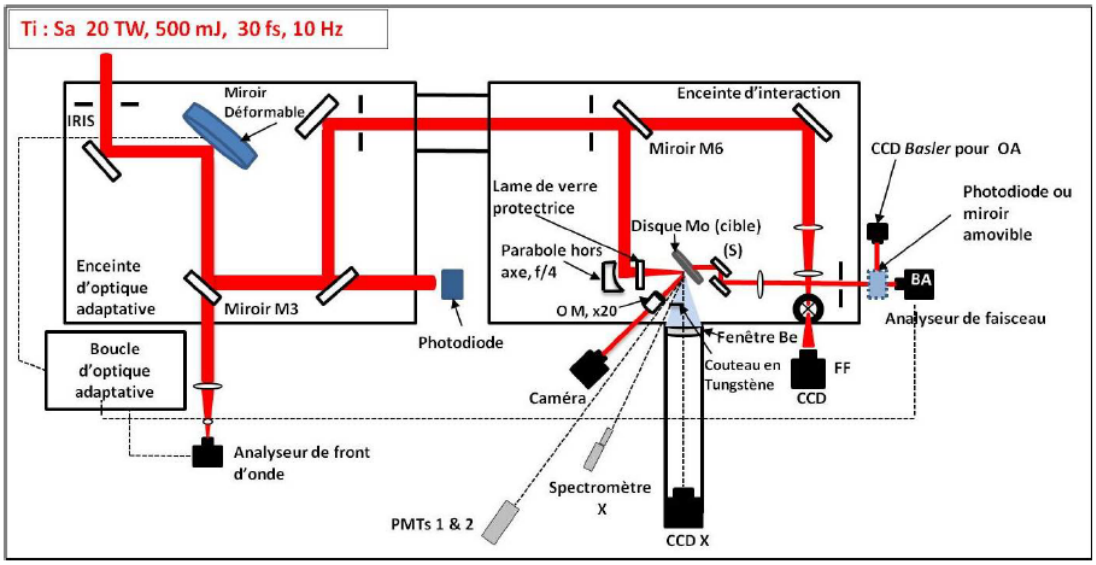

Fig 1.13 : Schéma optique de l'enceinte d'optique adaptative et de l'enceinte d'interaction.

Le front d'onde du faisceau laser comporte un certain nombre d'aberrations induites par les différents éléments de la chaine laser elle-même, ainsi que par les composants optiques assurant le transport et la mise en forme du faisceau entre la sortie du compresseur et la cible. Ces aberrations dégradent la qualité optique du faisceau, ce qui entraine une intensité sur cible plus faible et moins bien répartie spatialement que celle qui serait obtenue pour un faisceau parfait limité par la diffraction. C'est pour corriger ces aberrations qu'une enceinte d'optique adaptative a été conçue. Nous avons choisi de travailler avec une solution développée par Imagine Optic [Lefaudeux 2011]. Leur dispositif est composé d'un miroir déformable équipé de 32 actuateurs mécaniques, d'un analyseur de front d'onde Shack-Hartmann, et d'une caméra CCD. La correction du front d'onde est réalisée en deux étapes. Dans un premier temps, les aberrations induites par la chaine laser sont corrigées afin d'obtenir un front d'onde plan après le miroir déformable. Pour ce faire, le Shack-Hartmann mesure le front d'onde sur la fuite du miroir suivant le miroir déformable. Puis la boucle de rétroaction et l'algorithme associé permettent de générer une configuration du miroir qui corrige ces déformations du front d'onde. Dans un second temps, les aberrations introduites par les éléments optiques situés entre le miroir déformable et la cible sont précompensées. Cette étape est réalisée en observant par l'intermédiaire de la caméra CCD Basler la tache focale après la parabole, et en optimisant ses caractéristiques en trouvant la meilleure configuration du miroir déformable. Sont rapportés figure 1.14 les premiers résultats obtenus pour l'optimisation de la tâche focale. On constate que la boucle d'optique adaptative permet de mieux focaliser l'impulsion, notamment en éliminant les rebonds et en concentrant l'énergie. Cette correction permet d'augmenter l'intensité laser d'un facteur 1,3.

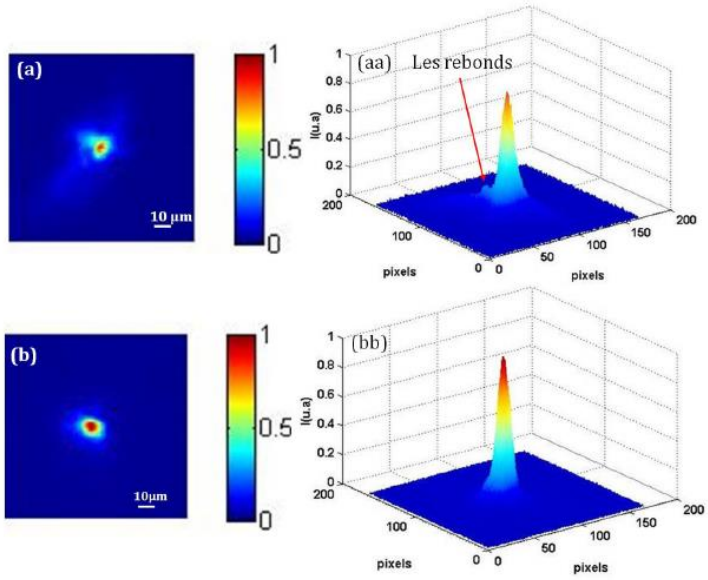

Figure 1.14 : Correction des aberrations de l'impulsion laser avec la boucle d'optique adaptative. Répartition spatiale 2D (a) et 3D (aa) de l'intensité après focalisation, avant application de la boucle d'optique adaptative. Répartition spatiale 2D (b) et 3D (bb) après correction.

Concernant la mise en forme temporelle, il faut dans un premier temps obtenir les impulsions les plus courtes possibles pour atteindre les puissances crêtes les plus élevées. Comme on l'a évoqué précédemment, durée et largeur spectrale de l'impulsion sont liées. Et pour obtenir les durées d'impulsions les plus courtes, il faut que les différentes composantes spectrales de l'impulsion soient en phase, c'est-à-dire que la phase spectrale soit constante, ou tout du moins la plus plate possible sur l'ensemble du spectre de l'impulsion. Cette phase spectrale peut être optimisée en jouant sur la distance entre les réseaux de diffraction du compresseur. Nous allons nous attarder ici surtout sur l'amélioration du contraste temporel. Parmi les différentes techniques existantes (on peut citer les techniques XPW, miroir plasma [Doumy 2004] ou doublage en fréquence [Toth 2007]), nous avons choisi l'utilisation d'absorbant saturable qui ne complexifie pas le montage et

est très simple à mettre en œuvre. Un absorbant saturable est un matériau dont la transmission varie avec l'intensité lumineuse à laquelle il est exposé. Il absorbe en particulier les intensités laser les plus faibles jusqu'à un certain seuil. Dans notre cas, l'absorbant saturable utilisé est un verre RG850. Il s'agit d'un verre dopé avec des nanocristaux de semiconducteurs (CdSe, CdS, CdTe, ZnSe…), classiquement utilisé comme filtre passe haut à 850 nm. Les semiconducteurs utilisés possèdent une bande interdite d'énergie égale à celle des photons émis. Ainsi les photons du laser sont absorbés tant que des électrons de valence peuvent être excités vers la bande de conduction. Une fois ce seuil dépassé, les photons sont transmis. Sur les chaines laser de puissance, l'absorbant saturable va donc permettre de réduire l'intensité du piédestal, et ainsi améliorer le contraste temporel. Nous avons étudié trois configurations différentes : aucun absorbant implémenté dans la chaîne, un absorbant présent (en l'occurrence, celui du Booster), ajout de deux absorbants pour en avoir trois au total dans la chaine laser. Les traces temporelles et les contrastes mesurés sont rapportés figure 1.15.

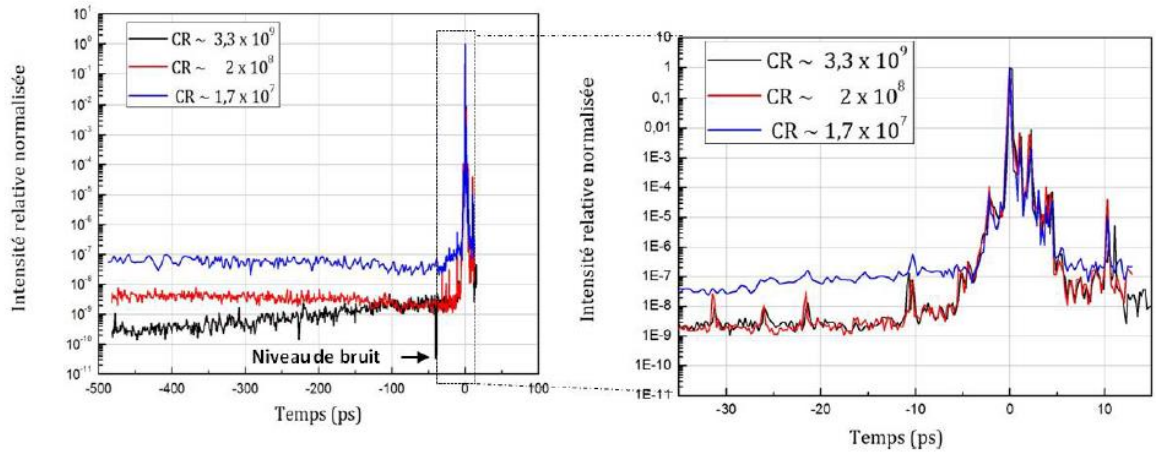

Figure 1.15 : Contraste temporel pour les 3 configurations étudiées. Courbe bleue : aucun absorbant. Courbe rouge : absorbant du booster. Courbe noire : absorbant du booster et ajout de deux absorbants.

Les absorbants n'ont pas d'effet sur le contraste à des échelles de temps courtes (moins de 5 ps avant le pic principal, contraste cohérent). Sur les échelles de temps plus longues, différents comportements sont observés. Pour les configurations sans ou avec un absorbant, l'intensité forme approximativement un plateau. Par contre, avec trois absorbants, l'intensité décroit entre - 100 et - 350 ps. Le plateau observé est caractéristique de l'ASE. L'ajout d'absorbants saturables permet donc d'atténuer sensiblement ce piédestal, et ainsi d'obtenir des valeurs de contrastes plus intéressantes. Nous obtenons des contrastes de $\sim 1{,}7 \times 10^{7}$ sans absorbant, $\sim 2 \times 10^{8}$ avec un absorbant et de $\sim 3{,}3 \times 10^{9}$ avec 3 absorbants.

Les résultats rapportés dans cette partie correspondent aux premières expérimentations qui ont été réalisées sur cette chaine laser, juste après la conception et l'installation des différentes lignes d'expérience. Ces premiers jalons ont permis par la suite (après mon départ du LP3) d'obtenir des résultats très intéressants qui positionnent la source parmi les meilleures sources plasma laser avec des performances qui permettent d'adresser les applications visées [Azamoum 2018a] [Azamoum 2018b]. La figure 1.16, extraite de [Azamoum 2018b], rapporte les rendements de production de rayons X obtenus. La qualité de cette source a permis à l'équipe du LP3 de réaliser les premières images de contraste de phase en source plasma relativiste avec des intensités crête autour de 10^{19} W/cm² (figure 1.17, [Gambari 2020]). Sur cette application, ces images représentent la première concrétisation du développement que j'ai initié en travaillant sur le dimensionnement de

l'imagerie X. Ces premiers résultats sont encourageants, et les travaux continuent sur cette thématique.

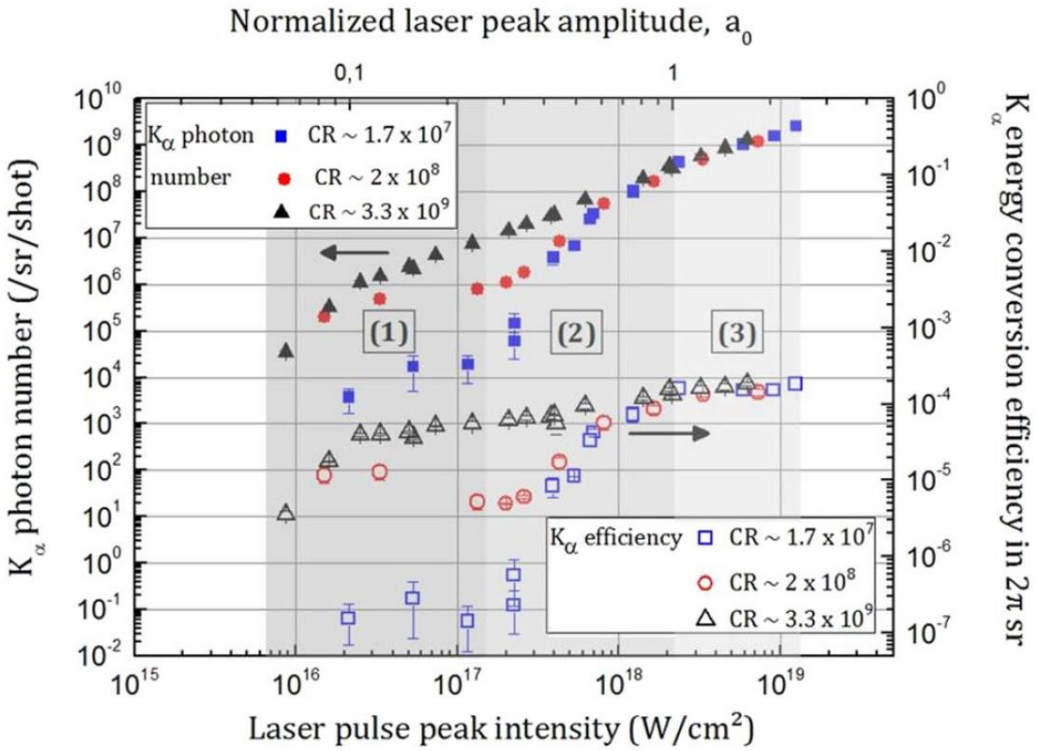

Figure 1.16 : Nombre de photons K_α et efficacité de conversion obtenus suivant l'intensité laser crête. Les résultats sont présentés pour les trois différentes valeurs de contrastes obtenues avec les configurations utilisant les absorbants saturables présentés ci-dessus [Azamoum 2018b].

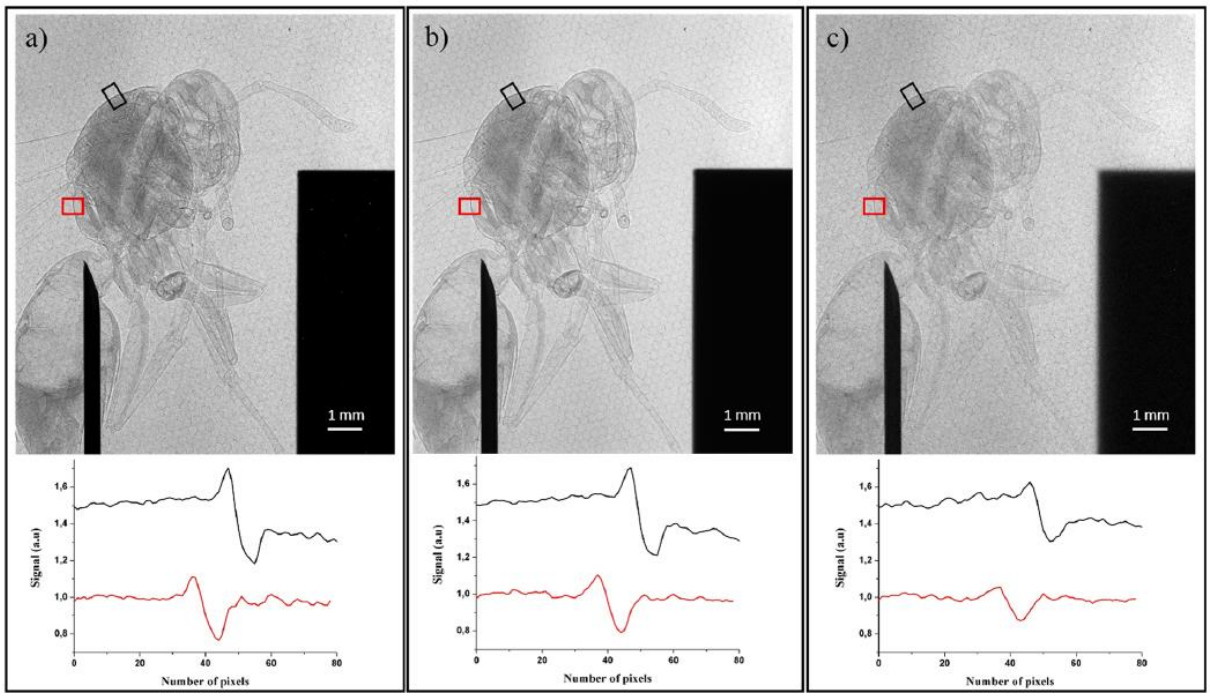

Figure 1.17 : Images de contraste de phase X obtenues sur une guêpe. Le rectangle noir à droite est le couteau permettant de contrôler pendant l'acquisition la taille de la source X. Sous l'image sont tracés deux profils illustrant le contraste correspondant aux rectangles noir et rouge. Les trois images correspondent à trois valeurs d'intensité crête différentes pour la source laser : (a) pour $I = 2{,}7 \times 10^{17}$ W/cm², (b) pour $I = 1{,}0 \times 10^{18}$ W/cm², (c) pour $I = 7{,}2 \times 10^{18}$ W/cm² [Gambari 2020].

II.4 - Encadrement

Les études de dimensionnement sur le contraste des images et sur la dose envoyée pour une application de la source X à la mammographie ont été réalisées par Adrien STOLIDI lors de son stage de Master 2 de Physique Médicale (2013). Maxime LOPEZ a travaillé sur la mise en place de la caractérisation de l'émission X lors de son stage de Master 2 de Physique - Spécialité Rayonnement, Energie, Spectroscopies (RES) (2014), travaux non présentés ici. Enfin j'ai coencadré de septembre 2012 à juin 2014 le début de la thèse de Yasmina AZAMOUM (soutenance en octobre 2016).

II.5 - Publications et communications

LISTE DES PUBLICATIONS
Articles publiés dans des revues avec comité de lecture

[A9] PASQUIER C., BLANDIN P., CLADY R., SANNER N., SENTIS M., UTEZA O., LI Y., YAN LONG S., "Handling beam propagation in air for nearly 10-fs laser damage experiments", *Optics Communications* **355**, p 230-238 (2015)
DOI: 10.1016/j.optcom.2015.06.049

LISTE DES PUBLICATIONS
Articles publiés dans des proceedings ou des revues sans comité de lecture

[P11] UTEZA O., BLANDIN P., CLADY R., PASQUIER C., SANNER N., SENTIS M., LI Y., LONG S.Y., "Laser damage test-bench with ultrashort pulses down to 10 fs", *Proceedings of SPIE* **9237**, UNSP 923727 (2014)
DOI: 10.1117/12.2068007

[P10] UTEZA O., BLANDIN P., CHARMASSON L., COUSTILLIER G., GROJO D., KABASHIN A., LEBUGLE M., SANNER N., TCHEREMISKINE V., SENTIS M., LEGARE F., KIEFFER J.C., "ASUR: plateforme d'applications des sources laser ultra-rapides pour l'imagerie X et l'interaction laser-matière", *UVX2012 - 11e Colloque sur les Sources Cohérentes et Incohérentes UV, VUV et X ; Applications et Développements Récents*, 01004 (2013)
DOI: 10.1051/uvx/201301004

COMMUNICATIONS A DES CONGRES

[CI2] UTEZA O., BLANDIN P., CHARMASSON L., COUSTILLIER G., GROJO D., KABASHIN A.V., LEBUGLE M., SANNER N., TCHEREMISKINE V., SENTIS M., LEGARE F., KIEFFER J.C. , "ASUR: plateforme d'applications des sources laser ultra-rapides pour l'imagerie X et l'interaction laser-matière", *Colloques sur les Sources Cohérentes et Incohérentes UV, VUV et X: Applications et développements récents (UVX 2012)*, Biarritz, France, Juin 2012

[CP12] UTEZA O., BLANDIN P., CLADY R., PASQUIER C., SANNER N., SENTIS M., LI Y., LONG S.Y., "Laser damage test-bench with ultrashort pulses down to 10 fs", *SPIE Laser Damage - 46th Annual Symposium on Optical Materials for High Power Lasers*, Boulder, Etats-Unis, Septembre 2014

[CA17] AZAMOUM Y., TCHEREMISKINE V., BLANDIN P., CLADY R., CHARMASSON L., SANNER N., UTEZA O., SENTIS M., "Development of an Energetic Sub-Picosecond Laser-Plasma X-Ray K-α Source with a High Pulse Repetition Rate", *International Conference on Ultrahigh Laser Intensity (ICUIL)*, Goa, Inde, Octobre 2014

[CA16] AZAMOUM Y., TCHEREMISKINE V., BLANDIN P., CLADY R., CHARMASSON L., SANNER N., UTEZA O., SENTIS M., "Generation and characterization of a sub-picosecond laser-based hard X-ray Kα source with a high pulse repetition rate", *Advanced Laser Technology*, Cassis, France, Octobre 2014

[CA15] UTEZA O., BLANDIN P., CLADY R., SANNER N., SENTIS M., LI Y., LONG S.Y., "Laser damage test-bench with ultrashort pulses down to 10 fs", *SPIE Laser Damage 2014*, Boulder, Etats-Unis, Septembre 2014

[CA14] AZAMOUM Y., TCHEREMISKINE V., BLANDIN P., CLADY R., CHARMASSON L., SANNER N., UTEZA O., SENTIS M., "Génération d'une source de rayons X, Kα intense sub-picoseconde par plasma laser à fort taux de repetition", *Congrés Société Française de Physique – Division Plasmas*, Toulouse, France, Mai 2014

[CA11] BLANDIN P., CHARMASSON L., COUSTILLIER G., GROJO D., KABASHIN A., LEBUGLE M., SANNER N., TCHEREMISKINE V., UTEZA O., SENTIS M., LEGARE F., KIEFFER J.C., "ASUR: Ultra-fast Laser Source Application Infrastructure", *Light at Extreme Intensities*, Szeged, Hongrie, Novembre 2011.

[CA10] UTEZA O., BLANDIN P., CHARMASSON L., COUSTILLIER G., GROJO D., KABASHIN A., LEBUGLE M., SANNER N., TCHEREMISKINE V., SENTIS M., LEGARE F., KIEFFER J.C., "ASUR: plateforme d'applications des sources lasers ultra-rapides", *9ème Journée des Phénomènes Ultra-rapides*, Rouen, France, Octobre 2011.

[CA9] BLANDIN P., CHARMASSON L., COUSTILLIER G., GROJO D., KABASHIN A., LEBUGLE M., SANNER N., TCHEREMISKINE V., UTEZA O., SENTIS M., "ASUR : plateforme d'applications des sources lasers ultra-rapides", *Horizons de l'Optique*, Marseille, France, Juin 2011

De l'instrumentation pour … s'adapter aux échantillons

Dans cette seconde partie, il va être question de microscopie biophotonique, et de mise au point de systèmes d'imagerie utilisables en laboratoire de biologie. Assez souvent en imagerie, et plus précisément en microscopie, un critère essentiel pour le développement d'un système est la résolution spatiale. L'objectif est d'observer avec la plus grande finesse des échantillons, typiquement des cellules, individuellement, ou par groupe de quelques-unes. C'est dans cette tendance que s'est inscrite la course à la superrésolution observée ces dernières années, pour résoudre des structures de plus en plus petites à l'intérieur des cellules. La préoccupation d'obtenir ces informations avec une haute résolution spatiale dans les trois dimensions de l'espace est également de premier ordre, et explique l'effervescence autour de techniques comme la microscopie de fluorescence à feuillet de lumière, ou la tomographie pour le contraste de phase.
Pour certaines problématiques, la résolution n'est pas le seul paramètre important, et l'optimisation du compromis entre la résolution et la taille du champ de vue peut être un axe important pour le développement de systèmes. En travaillant sur ce compromis, on peut espérer observer un nombre plus important d'objets, par exemple pour améliorer la statistique, ou bien pour observer l'interaction des cellules entre elles et leur organisation. Dans ce cas, le système d'imagerie doit posséder la résolution suffisante pour résoudre l'objet individuel, mais également le champ de vue nécessaire pour observer un nombre assez important d'objets. En d'autres termes, le système doit s'adapter à l'échantillon.
Les travaux présentés dans ce chapitre s'inscrivent dans cette approche. Ils ont été réalisés au CEA/LETI, dès mon arrivée. Pour répondre aux besoins des partenaires académiques ou industriels utilisateurs de ces systèmes, se sont ajoutées des contraintes en termes d'encombrement et de simplicité d'utilisation, pour pouvoir travailler avec ces systèmes dans des laboratoires de biologie. Deux développements vont être exposés plus précisément:

- des systèmes d'imagerie bimodale phase/fluorescence à faible grandissement pour l'observation de populations cellulaires ;
- un système de microscope de fluorescence à feuillet de lumière pour étudier des organoïdes dans des cartes microfluidiques.

Ainsi les développements présentés ont été menés sur une voie quelque peu alternative, pour obtenir à la fois les performances optiques et la configuration géométrique vraiment adaptées aux échantillons étudiés.

I - Un microscope grand champ bimodal

I.1 - Introduction et objectif des travaux

Pour analyser un nombre important d'objets sur le terrain, avec des performances statistiques comparables à la cytométrie mais avec des systèmes beaucoup plus simples, « l'imagerie sans lentille », s'est imposée comme une solution pertinente ces dernières années. L'engouement actuel pour cette méthode d'imagerie (on recense aujourd'hui une quarantaine d'équipes de recherche travaillant sur ce thème) a plusieurs explications [Roy 2017]. La première est qu'elle utilise une instrumentation extrêmement simple basée sur des composants grand publics hautement performants (capteurs matriciels, tels que des caméras CMOS de smartphone ou de vision industrielle, et sources lumineuses ponctuelles de type LED ou diode laser éventuellement filtrées spatialement et spectralement), ce qui permet d'avoir des systèmes transportables sur le terrain et très peu chers (moins de 100 €). Le « coût » de la méthode, aussi bien au niveau de la complexité qu'au niveau financier est reportée sur le traitement numérique (reconstruction et traitement d'images) associé à cette acquisition [Wu 2018]. La seconde explication tient plus aux performances d'imagerie du système : dans la configuration utilisée avec l'échantillon au plus près du capteur, le système a un grandissement d'environ 1, ce qui donne un champ de vue égal à la taille du capteur (typiquement 30 mm^2), et une résolution de l'ordre de quelques µm, directement reliée à la taille des pixels. Aussi, cela permet d'avoir accès en une seule image à un nombre important d'objets, et de pouvoir assurer un suivi temporel de ces objets. Un certain nombre d'applications de grand intérêt en biologie peut dès lors être adressé [Kim 2012] : le suivi de cultures cellulaires [Scholz 2019] et la viabilité [Roy 2016], l'analyse de spermatozoïdes et de leur mobilité [Daloglu 2018], la détection de parasites [Zhang 2018], l'analyse du sang [Seo 2010].
Ces performances spatiales, et notamment ce compromis entre champ de vue et résolution sont extrêmement intéressantes. Mais avec cette approche, nous sommes limités à des contrastes d'absorption et de phase. De plus, pour obtenir des valeurs de phase proches des « vraies » valeurs, des algorithmes de reconstruction assez évolués, basés sur des a priori et des contraintes sont nécessaires. En effet, la technique d'imagerie utilisée est de l'holographie en ligne sans bras de référence, ne permettant pas d'enregistrer une information quantitative sur la phase à l'acquisition. Par ailleurs, la résolution spatiale est limitée par la taille des pixels au niveau du détecteur : l'échantillon étant très près du capteur, l'ouverture numérique de collection est importante, mais l'échantillonnage spatial est lui plus limité. L'ajout d'optique à faible grandissement peut donc permettre d'améliorer ces limitations, tout en conservant des performances spatiales intéressantes, avec un grand champ de vue couplé à une résolution suffisante.
L'imagerie sans lentille est développée au CEA/LETI/DTBS/LSIV depuis 2009, et a démontré ses apports pour un certain nombre d'applications. L'essentiel des évolutions apportées au laboratoire concernait les aspects numériques. J'ai pour ma part essayé d'améliorer globalement les performances de ce type de systèmes en jouant sur l'instrumentation. C'est ce qui est rapporté dans ce paragraphe. Dans un premier temps, je vais présenter des améliorations proposées sur le montage d'imagerie sans lentille holographique et les premières tentatives pour ajouter une modalité de fluorescence. Dans un second temps, je reviendrai sur le développement d'un système de microscopie présentant des performances optiques (champ de vue, résolution) en phase et en fluorescence comparables à celles de l'imagerie sans lentille, mais en utilisant une optique.

I.2 - Cadre des travaux et collaborations

Comme expliqué, l'imagerie sans lentille est une activité forte du LETI/DTBS/LSIV, lancée en 2009. Quand j'ai rejoint le laboratoire, j'ai intégré cette thématique et interagi avec les collègues impliqués. Un grand savoir-faire a été développé en interne sur les aspects numériques, notamment dans les algorithmes de reconstruction des images. J'ai donc bénéficié de cet environnement pour mener mes travaux, et j'ai été associé à certains travaux menés par les collègues sur d'autres applications. L'essentiel de mon activité sur l'imagerie sans lentille a été réalisée dans le cadre du laboratoire commun avec la société HORIBA Medical, sur des problématiques d'hématologie (début du laboratoire commun : 2014, collaboration toujours en cours). A travers ce partenariat, j'ai pu collaborer avec Cathy TRUMEL et son équipe de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse sur des problématiques d'hématologie touchant les chiens. Les développements en imagerie sans lentille menés dans ce cadre étaient toujours associés à des travaux en microfluidique pour la préparation et la mise en forme des échantillons, travaux réalisés par les collègues du DTBS et principalement Yves FOUILLET.
Concernant la fluorescence, quand j'ai rejoint le LSIV, il n'y avait plus d'activité sur ce thème. J'ai donc relancé les activités tout d'abord à travers le stage de Mathieu LEROY (2016), puis à travers la thèse d'Isaure DE KERNIER (2016-2019). Pour cette thèse, nous avons travaillé en collaboration avec HORIBA Medical, qui a financé la thèse toujours pour des applications en hématologie. J'ai également construit une collaboration avec l'Institut Fresnel et Serge MONNERET, qui était le directeur de thèse d'Isaure DE KERNIER. Cette collaboration perdure puisque le montage développé est testé pour de nouvelles applications à l'Institut Fresnel. En parallèle, d'autres dispositifs bimodaux ont été développés par des collègues au LSIV, et j'ai été là aussi associé à certains travaux.

I.3 - Principaux résultats

I.3.a - Imagerie sans lentille et ajout de la fluorescence

En imagerie sans lentille, l'instrumentation est réduite au strict minimum : l'essentiel des efforts est réalisé sur la partie numérique. J'ai pris part à ce travail en algorithmie, en échangeant avec les collègues [A10, B3, B1, CO9], ou en étant moteur pour certains développements spécifiques aux applications en hématologie [B8, B5, CP18, CO12, CO8, CA19]. Je ne reviendrai pas dans ce manuscrit sur ces travaux. Pour les aspects instrumentaux, j'ai participé à la réalisation de maquettes d'imagerie sans lentille pour des acquisitions en milieu hospitalier [P12, P14, CP15, CP13]. Dans le cadre des développements en hématologie en collaboration avec la société HORIBA Medical, j'ai également participé aux échanges pour la mise au point du dispositif microfluidique couplé au dispositif d'imagerie sans lentille, et permettant la préparation de l'échantillon. La solution proposée basée sur une technologie de membrane déformable développée par le laboratoire de microfluidique (LSMB) du département DTBS, a dû en effet intégrer des contraintes liées à l'imagerie, concernant la dilution, ou le nettoyage de la chambre d'observation [B6, CA22].
Je vais m'attarder ici sur deux aspects que j'ai creusés en lien avec les applications en hématologie. Dans ce domaine, l'étude des plaquettes est un défi. En effet, ces cellules sont d'une part des objets

de phase pure (pas d'absorption de la lumière par l'échantillon ; cette hypothèse est souvent faite pour l'étude des cellules en imagerie de phase, mais elle est rarement aussi bien vérifiée que par les plaquettes), et d'autre part mesurent typiquement entre 2 et 4 µm. Aussi nous devons étudier un objet avec un faible contraste et une étendue spatiale en limite de résolution des capteurs utilisés (taille de pixel 1,67 µm). Nous avons donc joué sur l'instrumentation pour améliorer la résolution et la sensibilité de l'imagerie sans lentille holographique.
La première solution sur laquelle j'ai travaillé s'appuie sur la « super-résolution de pixels » (pixel super-resolution en anglais) [Park 2003]. Cette technique peut s'utiliser quand plusieurs images de la même scène sont acquises, chaque image de la série étant spatialement décalée d'un nombre non entier de pixels différent par rapport à la première acquisition. Ensuite, numériquement, il faut « suréchantillonner » ces images en créant des pixels virtuels plus petits que les pixels physiques (par exemple d'un facteur 4, 9 ou 16). Par interpolation des niveaux de gris, on crée, à partir de chaque image, une image contenant plus de pixels plus petits. Toutes ces images sont ensuite recalées, puis ajoutées (ou moyennées) pour créer une unique image « haute résolution » de la scène. Dans notre approche, nous avons recalé les hologrammes pour obtenir un hologramme « haute résolution », et nous reconstruisons cet hologramme haute résolution avec les codes habituellement utilisés pour cette étape. Le gain sur l'image finale vient du fait qu'en positionnant différemment la même scène par rapport au capteur, on récupère de l'information spatiale. De plus, le fait d'acquérir plusieurs images améliore également le rapport signal à bruit par rapport à une unique acquisition. Cette technique a été utilisée pour l'imagerie sans lentille dès 2010 par l'équipe d'Ozcan [Bishara 2010], et on trouve différentes implémentations instrumentales pour acquérir ces différentes images (translation de la source par rapport à l'objet et au capteur, translation de l'objet par rapport à la source et au capteur), ainsi que différentes stratégies numériques, les plus récentes utilisant des réseaux de neurones [Liu 2019]. On peut remarquer que certaines équipes (comme celle d'Ozcan) associent à cette translation transverse de la scène une translation axiale (suivant l'axe optique) pour également récupérer l'information de phase en utilisant des algorithmes multi-z. Les algorithmes de recalage étant extrêmement performants, les déplacements successifs de la scène par rapport au capteur peuvent être réalisés de manière aléatoire. Faisant ce constat, nous avons proposé une solution originale en collant un élément piézoélectrique (de type « buzzer ») sous le capteur. Une première acquisition est réalisée dans une position du capteur par rapport à l'échantillon, puis le piézo est mis en vibration quelques instants (moins d'une seconde) et arrêté. Le capteur se situe alors dans une autre position aléatoire par rapport à l'échantillon, et ainsi de suite (figure 2.1).

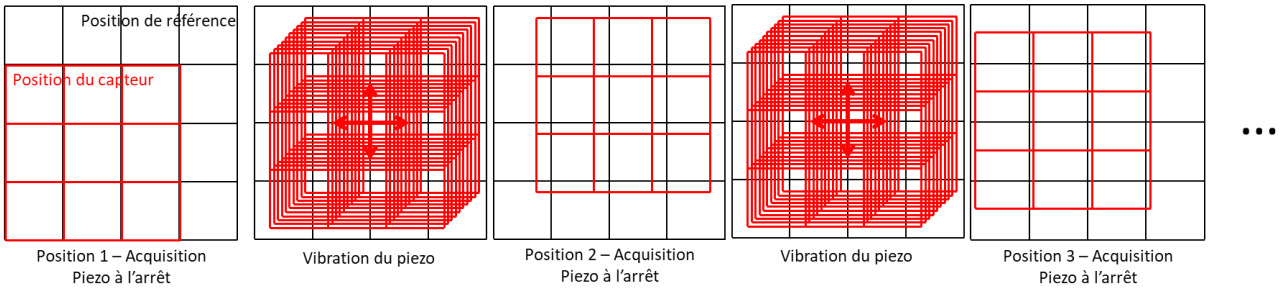

Figure 2.1 : Principe de la « super résolution de pixel » utilisant un élément piézoélectrique et un déplacement itératif aléatoire du capteur par rapport à la scène (fixe).

Le gain apporté est illustré sur un échantillon constitué d'un mélange de billes de silice de 3 et 6 µm (figure 2.2). Dans cet exemple, nous avons réalisé 16 acquisitions successives de la même scène, et nous avons divisé chaque pixel réel en 16 pixels virtuels.

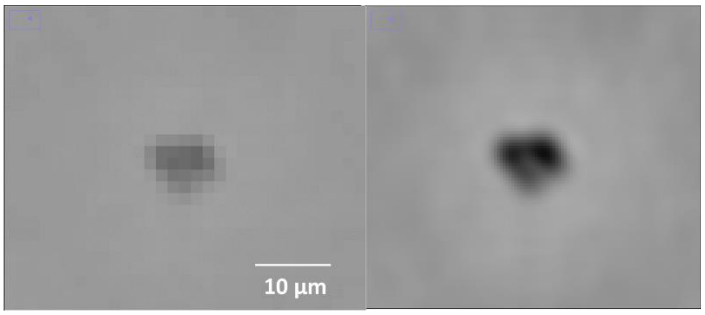

Figure 2.2 : Vignette d'une image reconstruite d'un amas de 2 billes de 6 µm et d'une bille d'1 µm. A gauche : image dans le plan de l'objet reconstruite à partir d'un seul hologramme. A droite, image reconstruite à partir de l'hologramme « haute résolution ». Cet hologramme a été obtenu avec 16 hologrammes « basse résolution ».

Cette solution s'est montrée efficace, mais elle n'a pas pu être appliquée simplement pour les plaquettes dans des échantillons sanguins. En effet, les échantillons sanguins étudiés étaient toujours du sang dilué, donc les cellules sont en suspension dans une solution aqueuse. Et dans ces conditions les plaquettes ont un mouvement brownien qui empêche d'appliquer le même recalage d'image pour tous les objets. La solution qui consisterait à appliquer l'algorithme de recalage à chaque objet a été abandonnée puisqu'extrêmement coûteuse en calcul : sur un champ complet, on peut compter jusqu'à 50 000 plaquettes. De plus la multiplication des acquisitions indispensables pour appliquer cette méthode augmente à la fois le temps et la quantité de données nécessaires à l'obtention d'une image.

La seconde solution a consisté à jouer sur la cohérence de la source. Pour notre imagerie par holographie en ligne, nous nous basons sur l'hypothèse que plus la source est cohérente, plus notre acquisition contiendra d'informations sur nos objets. L'approche classique est de prendre une source faiblement cohérente, et d'améliorer ses propriétés en ajoutant un filtre spatial (diaphragme ou fibre optique) de taille comprise entre 50 et 200 µm, et parfois même un filtre spectral pour passer d'une largeur de spectre de 50 nm à 10 nm voire moins. La solution proposée utilise une démarche différente : une source cohérente est utilisée (une diode laser) et son mode d'émission est dégradé pour lui faire perdre en cohérence. En effet, en utilisant une telle source en fonctionnement nominal, la cohérence est trop importante. Du speckle peut apparaître, ainsi que des franges créées par les interférences entre les différentes réflexions sur toutes les interfaces du montage. Et même si le montage comporte très peu d'éléments, il y a un certain nombre d'interfaces qui créent des franges, à commencer par le capot de protection du capteur, mais également le fond et le dessus de la chambre d'observation. Ce sont ces dernières franges qui sont les plus gênantes, puisque bien contrastées et de forme et de fréquence variables suivant le parallélisme des deux interfaces en jeu. Ces franges sont dues à la cohérence temporelle, et signifient que la « lame » qui crée les franges est d'une épaisseur optique inférieure à la moitié de la longueur de cohérence de la source (puisque les rayons interférant entre eux qui créent ses franges ont une différence de marche égale à un aller-retour dans la lame, c'est-à-dire deux fois son épaisseur). Or cette longueur de cohérence L_C est reliée à la largeur spectrale de la source $\Delta\lambda$ et à sa longueur d'onde moyenne λ par la formule :

$$L_c = \frac{2\ln(2)}{\pi} \times \frac{\lambda^2}{\Delta\lambda}$$

le coefficient $\frac{2\ln(2)}{\pi}$ s'appliquant lorsque l'on considère une source avec une distribution spectrale gaussienne [Born 1999]. Ainsi, en élargissant le spectre, la longueur de cohérence est réduite. Et un moyen d'élargir le spectre avec une diode laser est de réduire le courant d'alimentation pour passer sous le seuil laser. Dans ces conditions, le fonctionnement est intermédiaire entre la diode électroluminescente et la diode laser : le composant possède une cavité optique et un milieu amplificateur, mais l'amplification n'est pas suffisante pour avoir un effet laser. Sans aucune

amplification, le spectre d'émission de la source est large : il s'agit de la luminescence du matériau amplificateur, son émission spontanée. Lorsque le gain augmente, cette émission spontanée est amplifiée, mais cette amplification n'est pas uniforme sur toute la bande d'émission : ainsi se produit un rétrécissement de la bande spectrale d'émission par le gain (figure 2.3). Dans ces conditions sous le seuil laser, nous avons un phénomène de superluminescence. Il existe d'ailleurs des sources lumineuses dont le fonctionnement nominal est basé sur ce principe : les « superluminescent LED » ou sLED. Dans notre cas, nous « fabriquons » donc une sLED « sur mesure » (et moins chère, mais moins stable) en pilotant son courant d'alimentation.
Aussi, il faut avoir la plus grande cohérence possible pour maximiser l'information enregistrée sur le capteur, tout en ayant une longueur de cohérence de la source juste inférieure aux dimensions physiques des éléments pouvant créer des interférences. Le réglage du courant optimal est donc relativement simple pour un dispositif donné : la diode laser est utilisée dans des conditions d'effet laser, puis le courant d'alimentation est réduit jusqu'à ce que les franges disparaissent. Une autre solution, permettant d'assurer une plus grande reproductibilité des conditions entre différents montages, est de mesurer la largeur spectrale d'émission.

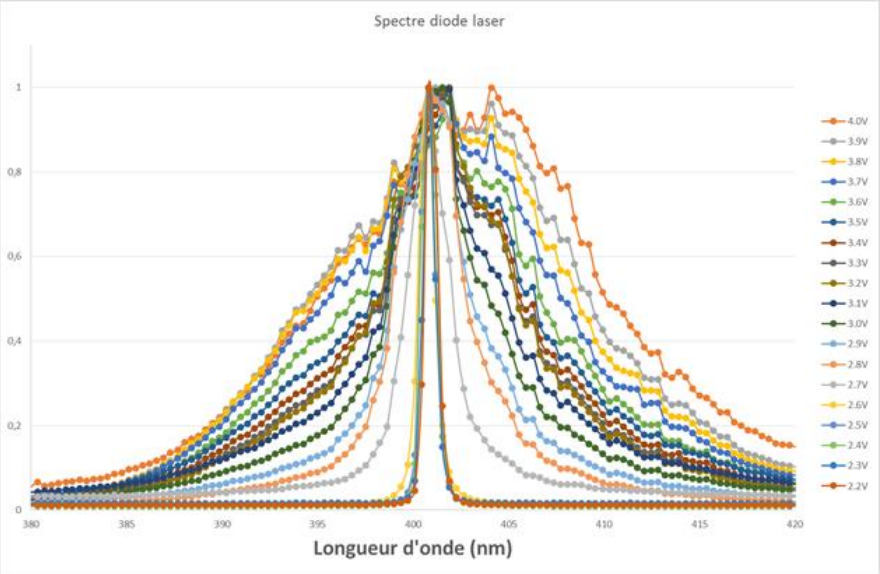

Figure 2.3 : Exemples des différents spectres obtenus pour une diode laser bleue en faisant varier l'intensité d'alimentation. Dans la légende apparaissent des valeurs de consigne en tension puisqu'un convertisseur courant tension est intégré dans la diode utilisée.

Cette solution a apporté un gain important pour la détection et le comptage des plaquettes. La figure 2.4 montre l'impact de la source à la fois concernant la longueur d'onde et la largeur spectrale sur la précision de comptage des plaquettes. La précision est estimée en comparant les valeurs mesurées avec notre système aux valeurs obtenues avec un automate de référence. Deux indicateurs sont scrutés : la pente de la courbe de tendance et le coefficient de détermination R^2 associé à cette courbe de tendance. Les résultats sont considérés comme acceptables pour l'application visée pour des valeurs de R^2 typiquement supérieures à 0.95. Concernant la pente, on souhaite s'approcher de la valeur unité, mais une correction de cette valeur de pente par calibration est acceptable. Comme on le voit, c'est avec une diode laser émettant à 405 nm avec une largeur spectrale de 4,6 nm qu'on obtient les meilleurs résultats, sans être gênés par des franges. Avec cet éclairage, la corrélation avec la référence est excellente (R^2=99%), et permet d'affirmer que la méthode est robuste. La pente de 0,72 quant à elle indique que le nombre de plaquettes donné par la méthode est systématiquement sous-estimé par rapport à la référence. Différents éléments comme l'incertitude sur le taux de dilution exact utilisé dans la préparation automatisée de l'échantillon, ou encore l'épaisseur de la chambre sont à l'origine de cet écart.

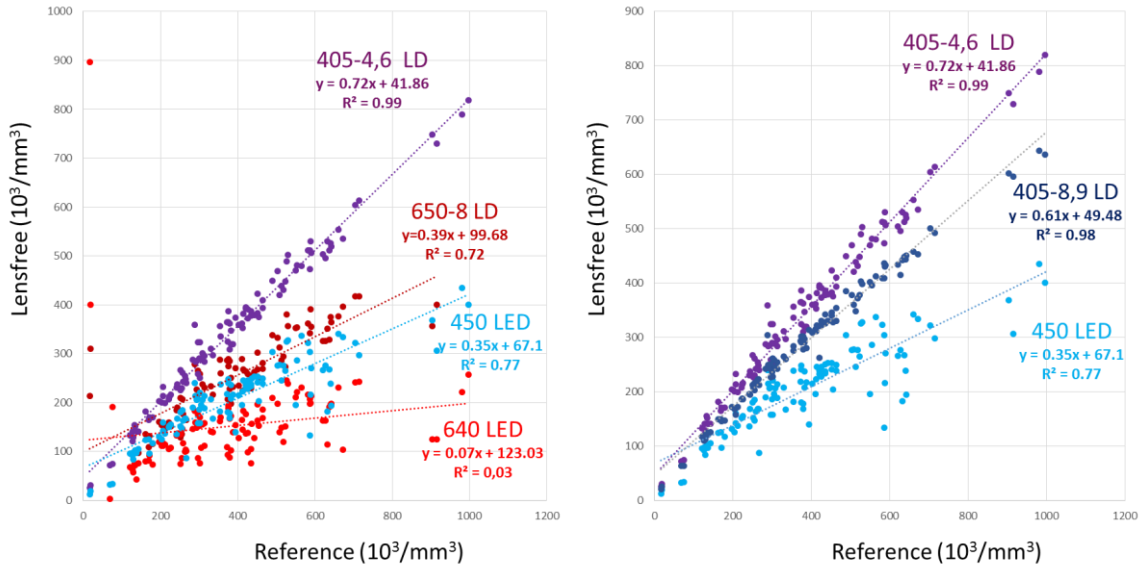

Figure 2.4 : Comparaison des concentrations de plaquettes dans différents échantillons sanguins obtenues en imagerie sans lentille et avec un automate d'hématologie de référence. Pour l'imagerie sans lentille, différentes sources d'illumination sont utilisées sur le même échantillon. A gauche, diode laser centrée à 405 nm avec une largeur spectrale réglée à 4.6 nm (violet), diode laser centrée à 650 nm avec une largeur spectrale réglée à 8 nm (rouge foncé), LED bleue centrée à 450 nm en utilisation nominale (bleu clair) et LED rouge centrée à 640 nm en utilisation nominale (rouge clair). A droite, diode laser centrée à 405 nm avec une largeur spectrale réglée à 4.6 nm (violet), diode laser centrée à 405 nm avec une largeur spectrale réglée à 8.9 nm (bleu foncé), LED bleue centrée à 450 nm en utilisation nominale (bleu clair).

En parallèle de ces développements en imagerie sans lentille, est apparu l'intérêt d'ajouter à cette modalité utilisant des contrastes de phase, de l'imagerie de fluorescence. En restant sur des schémas de microscopie assez classiques, une première architecture a été proposée permettant de réaliser en simultané une image grand champ en imagerie sans lentille, et une imagerie de fluorescence avec un grandissement relativement important (20x) sur une zone réduite d'intérêt de l'échantillon (figure 2.5). Pour réaliser un tel montage, il a été décidé de rendre « solidaires » l'échantillon et le capteur pour l'imagerie sans lentille, et de translater cet ensemble devant l'objectif pour sélectionner la région d'intérêt à imager en fluorescence. Ainsi, à chaque instant, l'échantillon peut être observé simultanément avec les deux modalités, moyennant un choix adapté de filtrage spectral sur chacune des voies. Pour s'assurer de la bonne mise en forme de l'éclairage pour l'imagerie holographique sans lentille, et surtout pour la rendre indépendante des réglages de mise au point de l'objectif, il a été décidé d'éclairer l'échantillon sans passer par l'objectif. Pour limiter l'angle d'incidence, un objectif à très grande distance de travail (Mitutoyo BD plan apo SL 20x, ON=0,28, distance de travail de 30,5 mm) a été choisi. Un petit module composé de trois LEDs (450 nm, 520 nm et 650 nm) filtrées spatialement (diaphragme de 150 µm) est positionné avec un angle d'environ 30 degrés par rapport à la normale au capteur. Dans ces conditions, nous obtenons des hologrammes déformés, mais des solutions numériques développées au laboratoire pour l'imagerie sans lentille en trois dimensions permettent de corriger ces déformations [Berdeu 2017]. D'une manière symétrique, un module d'éclairage pour la fluorescence, composé de 3 diodes lasers (405 nm, 520 nm et 658 nm) est positionné de l'autre côté de l'objectif. Associé à une lentille de tube de focale 200 mm, comme conseillé par Mitutoyo, l'objectif permet d'atteindre des performances en terme de résolution spatiale très proches de la limite de diffraction. Ce dispositif a pu être validé uniquement sur des billes fluorescentes (figure 2.6).

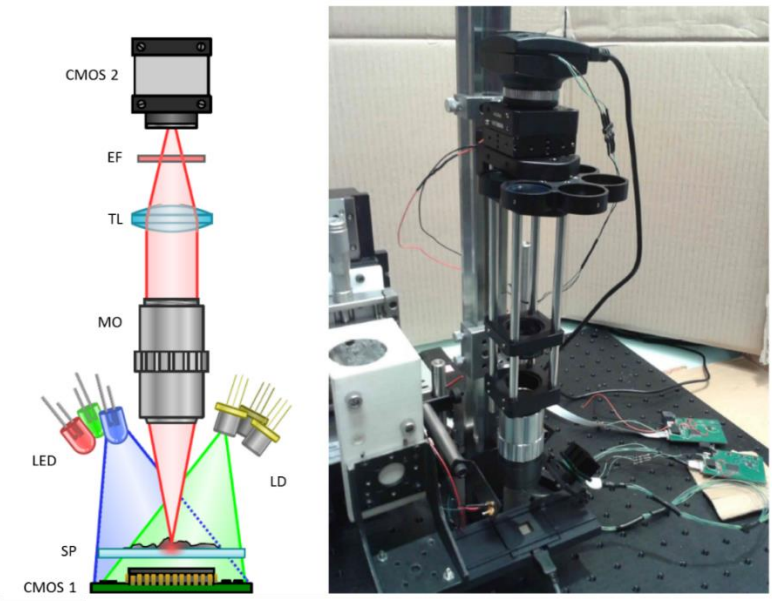

Figure 2.5 : Schéma (à gauche) et photographie (à droite) du montage associant imagerie de phase avec grandissement 1 par imagerie sans lentille, et imagerie de fluorescence avec grandissement 20. EF : filtre à l'émission, TL : lentille de tube, MO : objectif de microscope, LD : diodes lasers, SP : plan de l'échantillon.

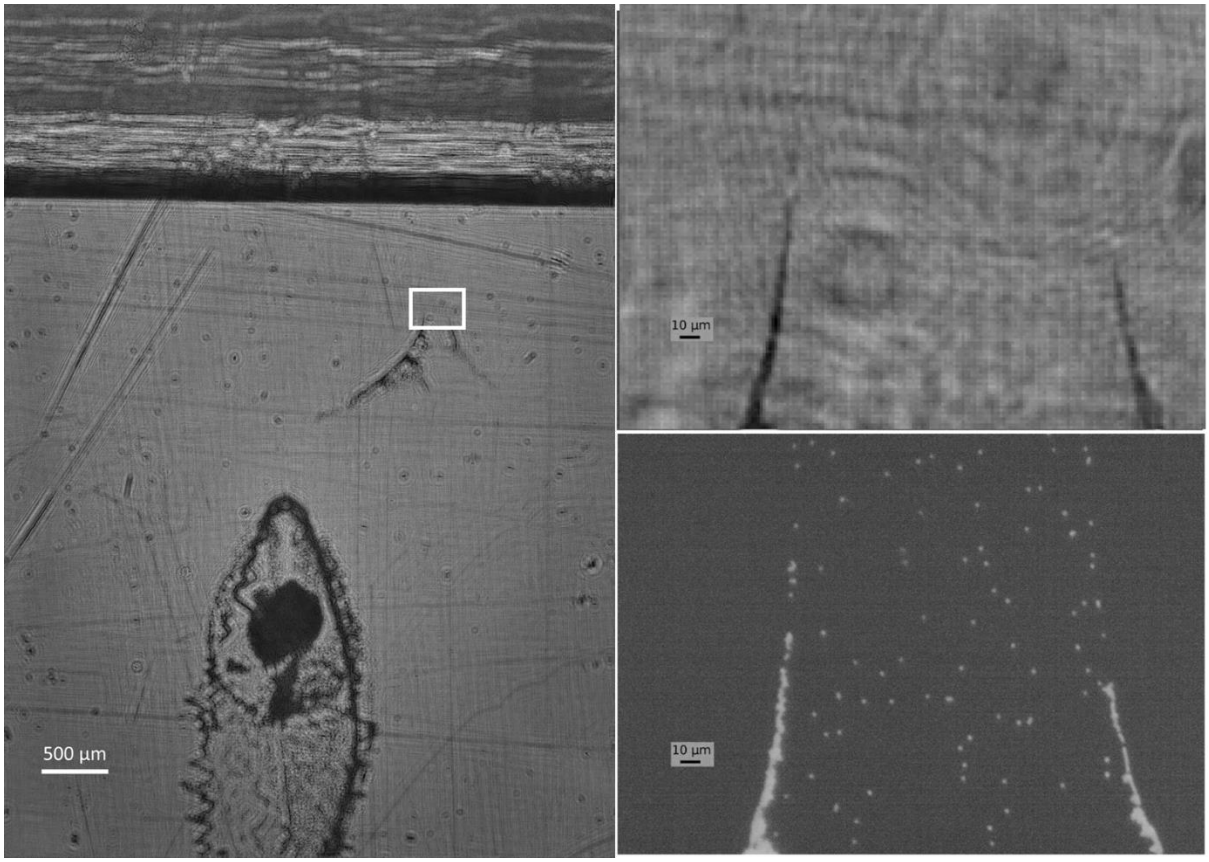

Fig. 2.6 : Images de billes fluorescentes de 2 µm. A gauche : reconstruction en amplitude de l'acquisition réalisée en imagerie sans lentille sur l'ensemble du champ de vue. En haut à droite : zoom de cette reconstruction correspondant au rectangle blanc. En bas à droite : image en fluorescence obtenu sur ce même champ de vue avec l'objectif 20x.

Cette solution a été la première au laboratoire à proposer cette bimodalité, mais malheureusement l'aspect « grand champ » n'était pas vrai pour l'imagerie de fluorescence. Ce système permettait de

travailler à différentes longueurs d'onde, et avec différents grandissements pour la fluorescence (changement d'objectif, avec cette contrainte d'une distance de travail relativement importante dans cette architecture). Enfin, l'automatisation complète devait permettre de pointer la zone d'intérêt sur l'image grand champ obtenue en phase, pour positionner grâce aux platines de translation cette zone sous l'objectif pour la fluorescence. Malgré ces performances intéressantes, ce développement n'a pas été poursuivi. En effet, ce système a fait naître l'envie d'avoir, pour l'imagerie de fluorescence, le même champ et la même résolution qu'en imagerie sans lentille.

I.3.b - Microscope bimodal grand champ avec objectif

Nous avons dès lors cherché à développer un nouveau système permettant d'imager en fluorescence et en phase le même champ de vue étendu, avec une résolution comparable pour les deux contrastes. Notre point de départ pour la microscopie de fluorescence, imagerie par nature incohérente, est de conjuguer le plan de l'échantillon avec le plan de détection. Cela nécessite donc de travailler avec au moins une optique de relais, et un détecteur, dans notre cas matriciel. C'est l'association, et l'adéquation de ces deux éléments qui va donner les performances globales du système. Comme expliqué en introduction, nous souhaitons pouvoir imager un grand champ de vue avec une résolution suffisante. Pour quantifier les performances d'un système d'imagerie en ce sens, on peut utiliser le rapport entre le champ de vue et l'aire de plus petit élément résolu (SBP ou space bandwidth product en anglais) [Lohmann 1996] :

$$SBP = \frac{FOV}{ps^2}$$

où FOV est la surface du champ de vue (supposé circulaire pour les systèmes utilisant des optiques) dans le plan image, indépendamment du capteur utilisé, et ps est la taille de pixel requise pour obtenir un échantillonnage de Nyquist dans ce plan, ou autrement dit la moitié de la résolution définie par le rayon du disque Airy de l'optique utilisée [Born 2011]. Cette grandeur peut être exprimée en « nombre de pixels ». La figure 2.7 illustre le SBP de différents systèmes d'imagerie.

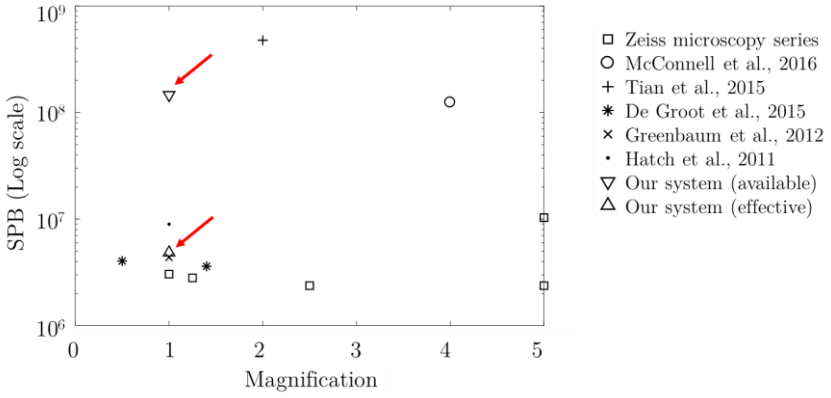

Figure 2.7 : Cette figure illustre le SBP limité des objectifs Zeiss standards à faible grandissement (1x à 5x) et les améliorations qui peuvent être apportées en utilisant par exemple des optiques spécialement conçues, plus grandes, pour la microscopie en champ clair et la fluorescence [McConnell 2016], ou pour la microscopie interférométrique [de Groot 2015], en utilisant un montage ptychographique [Tian 2015], avec un dispositif d'imagerie sans lentille utilisant la « super résolution de pixel » [Greenbaum 2012], ou encore avec un appareil photographique utilisant un objectif macro [Hatch 2011].

Bien que le SBP des objectifs d'appareils photographiques soit plus élevé que celui des objectifs de microscopes classiques, seuls quelques groupes ont rapporté l'utilisation de ces objectifs pour la microscopie [Orth 2014] [Pang 2013] [Jin 2015]. En effet, ces optiques ont été conçues et grandement optimisées pour travailler avec des capteurs 24x36mm² (au format complet, ce qui

représente un disque de 43 mm de diamètre dans le plan image soit 1 450 mm²), et des tailles de pixels autour de 5 µm. En les utilisant pour la microscopie, on les sort de leur domaine de fonctionnement nominal étant données les caractéristiques des capteurs utilisés dans ce domaine : un capteur plus petit va limiter le champ de vue, et donc le SBP total du système.
Pour les études en hématologie envisagées, nous avons décidé de travailler avec un objectif de photo macro dans un montage de grandissement 1. Nous avons vérifié que ce grandissement permettait d'observer les cellules sanguines spatialement résolues, et en un nombre suffisant sur le champ pour donner des informations statistiquement représentatives. Pour avoir un grandissement de 1 en valeur absolue, on utilise l'objectif dans un montage 2f-2f : l'objet est positionné à une distance 2f du plan principal objet et son image est donc située à une distance 2f du plan principal image, ce qui fait un grandissement de -1. Notre choix s'est porté sur l'objectif macro EF-100 mm f/2,8 USM (Canon). Ce choix a été motivé par les caractéristiques de l'objectif : sa focale, son ouverture, sa distance de travail. Par ailleurs, cet objectif propose d'excellentes performances optiques, et il apparait comme l'objectif de référence en photographie macro.
Comme on l'a vu, le choix du capteur est également extrêmement important. Le premier critère est sa surface : en choisissant un objectif d'appareil photographique, on a une image qui va se former dans un cercle de 43 mm de diamètre. Plus grand sera le capteur, mieux on utilisera ce champ. Le deuxième élément de choix est la taille des pixels pour l'échantillonnage de l'image. En appliquant le critère de Shannon-Nyquist, on peut considérer que l'échantillonnage de la réponse percussionnelle (ou fonction d'étalement du point, Point Spread Function – PSF- en anglais) dans un système avec un grandissement 1 nécessite des pixels mesurant au plus la moitié de la taille de la PSF. Théoriquement, une ouverture numérique de 0,1 fournit une PSF avec un rayon de :
$r = \frac{0{,}61\lambda}{NA} \sim 2{,}81$µm à 520 nm.
Des tailles de pixel aussi petites n'existent pas, ou très peu, dans les caméras scientifiques (CCD entre 10 et 15 µm, CMOS entre 5 et 7 µm). Par contre, tirée par les marchés des objets connectés (smartphones, tablettes, …), la technologie des capteurs CMOS grand public s'est largement développée, avec un accroissement des performances globales (notamment la sensibilité), une réduction de la taille des pixels (jusqu'à 1 µm aujourd'hui), mais donc à nombre de pixels constants (typiquement 10 ou 20 MPix) une réduction de la taille du capteur. Pour ce développement, nous avons sélectionné un capteur CMOS 11 Mpx 6,4 x 4,6 mm² (soit 29,4 mm²) monochromatique avec un pixel de 1,67 µm (UI-1492LE-M, IDS GmbH, Allemagne) résultant en un FOV de 29,4 mm². Cette taille de pixel optimise la résolution mais une taille de puce plus grande permettrait d'optimiser le SBP. Cependant, à notre connaissance, un tel capteur n'est pas disponible dans le commerce. Aussi sur la figure 2.7, nous avons rajouté deux points correspondant à notre système : un point avec le SBP effectif avec le capteur utilisé, un point avec le SBP disponible grâce à l'objectif utilisé, si on avait un capteur plus grand (à même taille de pixel).

Par rapport aux montages de microscopie classique, le système optique utilisé pour l'imagerie est sensiblement différent : il n'y a qu'une seule optique, pas d'association objectif - lentille de tube. Cela complexifie un peu le premier réglage : pour l'obtention du grandissement 1, il y a un seul positionnement respectif des plan objet, plan image et de l'optique qui soit possible, et la position des plans principaux n'est pas évidente à déterminer avec un objectif macro. Par contre, une fois ce réglage fait, la mise au point sera ajustée en déplaçant uniquement l'objet. Ce travail en grandissement 1 va également imposer des contraintes sur l'encombrement total du système : avec un objectif de focale 100 mm comme celui choisi, l'objet sera situé à environ 20 cm de l'objectif, et la caméra aussi, ce qui en prenant en compte l'encombrement de l'objectif macro (12,3 cm dans notre cas), fait un montage de plus de 50 cm, même si des replis des distances avec des miroirs sont envisageables. Ensuite, la grande ouverture de cette optique, et la taille importante des pupilles (78 mm de diamètre pour l'objectif) risquent d'introduire des aberrations hors axe. Même si la conception de l'objectif a été optimisée, avec une association de 15 lentilles réparties en 12 groupes, nous ne l'utilisons pas exactement dans les spécifications (normalement dans un appareil photo le

capteur est situé à environ 40 mm de l'arrière de l'objectif). Enfin, pour l'imagerie de fluorescence, ce montage ne permet pas de travailler en épifluorescence : il n'y a pas d'espace accessible dans lequel le faisceau soit collimaté, où on puisse introduire des lames séparatrices ou dichroïques sans dégrader l'image. Cela va également imposer des contraintes sur le filtrage spectral, puisque les performances des filtres interférentiels classiques sont dépendantes de l'angles. Pour terminer, on peut noter que ce type d'architecture utilisant des composants grands publics est peu cher : l'objectif macro coûte autour de 500 euros, et le capteur environ 250 euros.

Les éléments constitutifs du montage sont présentés sur le schéma de la figure 2.8. Je vais revenir ici sur deux points particuliers :
i) L'éclairage en champ clair. Nous utilisons ici une LED 4 couleurs, ou plus précisément 4 LEDs (bleu centré à 450 nm, vert centré à 540 nm, rouge centré à 640 nm et blanc) intégrées sur un même composant (XLamp XM-L Color LED, Cree Inc., USA). Cet éclairage sert pour la microscopie en champ clair classique, en faisant la mise au point sur l'échantillon, mais également pour l'imagerie de phase par holographie en ligne sans bras de référence. Pour cette imagerie, il faut faire une acquisition légèrement défocalisée (typiquement 150 μm). Des algorithmes de reconstruction basés sur la propagation de Fresnel, en ajoutant des a priori et des contraintes sur l'objet pour lever l'indétermination sur la phase, permettent de reconstruire le champ (amplitude et phase) au niveau de l'objet. Sont utilisés les mêmes algorithmes que ceux développés pour l'imagerie sans lentille. Pour optimiser les résultats dans ce cas avec lentille, on peut en plus ajouter une déconvolution par la réponse percussionnelle (PSF) de l'optique utilisée. Cette holographie impose quelques contraintes sur la cohérence de la source, notamment spatialement. C'est pourquoi la LED est couplée à une fibre optique (par exemple une fibre multimode de 105 μm de cœur, ouverte avec une ouverture de 0,22 – M15L01, Thorlabs) qui permet un filtrage spatial assurant une plus grande cohérence spatiale. De plus, la sortie de la fibre, qui va donc constituer la source ponctuelle d'illumination, est positionnée sur l'axe optique du système, pour éviter de générer des « hologrammes » déformés. Pour réduire également les aberrations hors axe causées par l'objectif macro, une lentille a été ajoutée pour rendre ce front d'onde de l'éclairage convergent sur la face d'entrée de l'objectif.
ii) L'éclairage pour la fluorescence. Une diode laser émettant à 505 nm est utilisée pour cette modalité (LBX-505-70-ESB-PPA, Oxxius) : cette longueur d'onde permettra de travailler avec les fluorophores d'intérêt pour les études en hématologie (FITC, Vybrant Green, Thiazole orange). On peut noter qu'un filtre passe bande centré à 504 nm est ajouté pour se débarrasser de l'émission spontanée amplifiée de la diode laser. Comme on l'a évoqué précédemment, en utilisant des filtres interférentiels, le filtrage spectral de l'excitation ne sera pas optimal sur notre montage. Ceci étant, on a vérifié que dans nos conditions, l'angle maximal de l'excitation en incidence direct sur le filtre est inférieur à 10 degrés, ce qui n'aura pas trop de conséquences. Pour éviter qu'une quantité trop importante de lumière excitatrice soit incidente directement sur le filtre, l'illumination arrive sur l'échantillon avec un angle relativement important (>30 degrés) pour ne pas être transmise par l'objectif. Pour l'imagerie de fluorescence, nous voulons juste avoir une excitation homogène sur la surface imagée, cet angle a donc peu d'impact. Par contre l'homogénéité doit être optimale sur l'ensemble de notre champ qui est large. Nous avons pour cela utilisé deux lentilles asphériques (ACL25416U-A, Thorlabs), pour réaliser une mise en forme comparable à celle proposée dans la référence [Saghafi 2014].

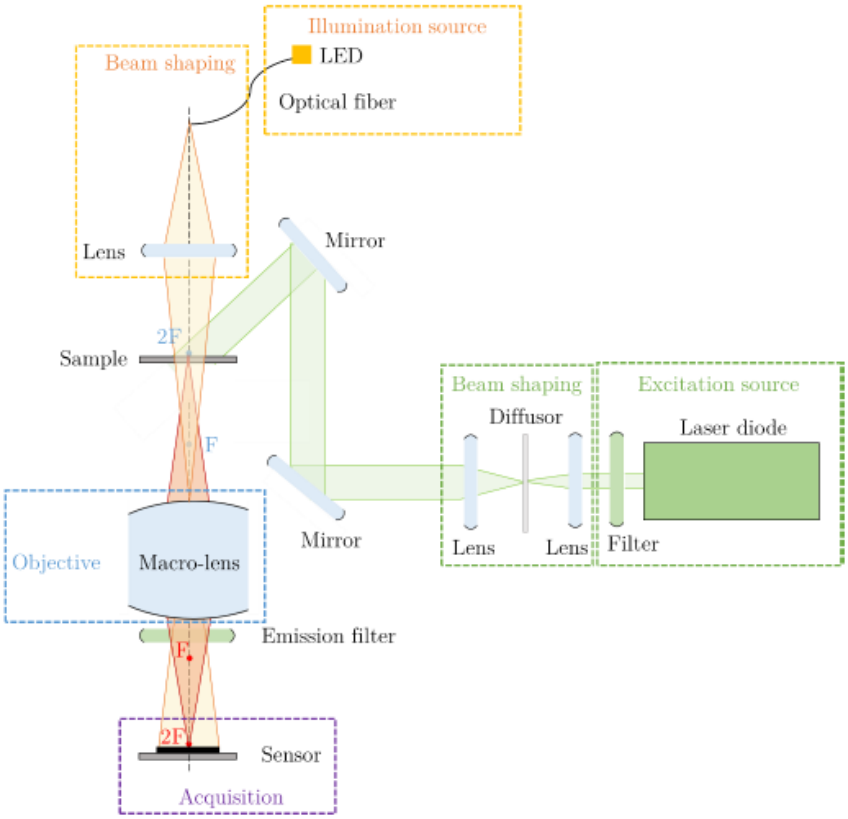

Figure 2.8 : Schéma du dispositif. Le même trajet optique est utilisé pour les deux modalités d'imagerie.

Avant d'adresser les problématiques hématologiques, le montage a été intégralement caractérisé. Pour commencer, le grandissement effectif est de 1,01 ± 0,1, et le champ de vue total au niveau de l'échantillon mesure 29,9 mm².
Ensuite la résolution spatiale a été mesurée pour les différentes modalités.
Pour l'imagerie en champ clair classique, une mire USAF1951 a été utilisée. Dans ce cas nous avons défini la résolution comme la taille des derniers motifs de la mire imagés avec un contraste supérieur ou égal à 20% (choix arbitraire). La résolution obtenue dépend de la longueur d'onde de l'éclairage : en utilisant la LED bleue (à 450 nm), nous mesurons une résolution de 2,76 ± 0,15 µm au centre du champ, et 3,91 ± 0,22 µm au bord du champ. Nous considérons ici l'incertitude comme étant égale à la moitié de la différence de taille entre le motif « résolu » et le premier motif « non résolu ». Ces mesures confirment une légère dégradation de la résolution à cause des aberrations hors axe.
Pour l'imagerie de phase, la notion de résolution est à utiliser avec encore plus de précautions, puisqu'en plus du choix de l'objet et de la configuration expérimentale, les algorithmes utilisés pour l'étape de reconstruction numérique peuvent sensiblement impacter la mesure [Hortsmeyer 2016]. Dans notre cas, l'objet utilisé est la mire USAF1951. L'éclairage est réalisé avec la source LED bleue injectée dans la fibre multimode de diamètre de cœur 105 µm (avec notre configuration d'holographie en ligne, la cohérence de la source impacte directement la résolution). La distance de « défocalisation » est fixée à 910 µm : ce paramètre influence également la résolution. Enfin l'algorithme de reconstruction utilisé a été développé par les collègues du LSIV : sans rentrer ici dans les détails, c'est un algorithme itératif, utilisant une seule acquisition en entrée, basé sur le propagateur de Fresnel, et une minimisation de la norme L1 du gradient du champ dans le plan objet par descente de gradient. Dans ce schéma, l'attache aux données (l'intensité sur le capteur) est forcée à chaque itération. Toujours dans le bleu, et en fixant le critère de contraste à 20%, nous obtenons une résolution de 4,38 ± 0,23 µm.
Pour l'imagerie de fluorescence, la résolution a été déterminée à partir de la mesure de la réponse percussionnelle du système. Pour réaliser cette mesure, des billes de 1 µm colorées avec de la GFP

(Green Fluorescent Protein) sont excitées avec un laser à 488 nm et imagées avec le système. Nous avons choisi d'appliquer le critère de Rayleigh : deux objets ponctuels sont séparables pour une configuration où la première annulation du disque d'Airy du premier objet correspond au maximum du disque du second objet. Cela définit une distance $\Delta r = 1{,}22\frac{\lambda}{e'}L$ avec λ la longueur d'onde, e' le diamètre de la pupille de sortie du système optique et L la distance entre l'objet et le système optique. Il est possible d'exprimer cette distance en fonction de $FWHM$, la mesure (en distance) de la largeur à mi-hauteur de la tâche d'Airy dans le plan objet situé à une distance L du système optique :

$$\Delta r = 1{,}22\frac{\lambda}{e'}L = 1{,}19\,FWHM$$

Aussi, nous appliquons cette formule pour calculer la résolution à partir d'une largeur à mi-hauteur de réponse percussionnelle mesurée grâce à un ajustement gaussien du profil : nous obtenons une résolution au centre de 4,41 ± 0,30 µm, et 4,72 ± 0,12 µm au bord du champ (incertitude obtenue en faisant la mesure sur 5 billes).

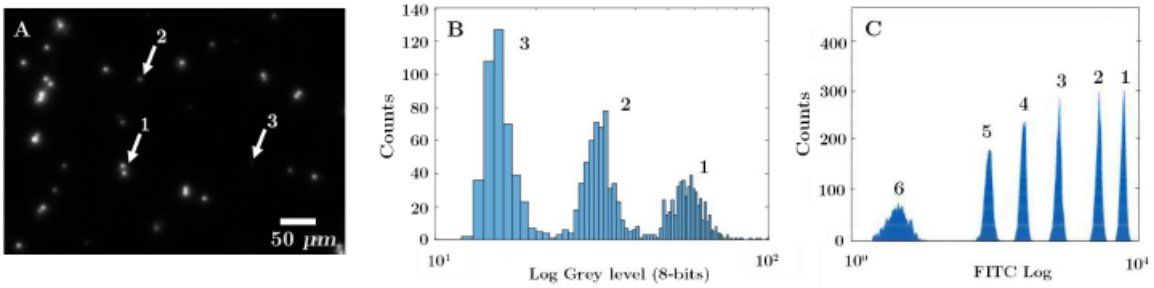

Figure 2.9 : Détection des billes de calibration fluorescentes. (A) Portion d'une acquisition brute montrant les billes avec trois niveaux de fluorescence différents. (B) Histogramme des niveaux de fluorescence détectés par notre système. (C) Histogramme des niveaux de fluorescence détectés par le cytomètre.

Puis la sensibilité a été caractérisée. Le capteur matriciel CMOS utilisé n'est pas un capteur scientifique : il n'est pas refroidi, on peut donc s'attendre à une détection bruitée. Le rendement quantique affiché par le constructeur n'est également a priori pas favorable : au mieux 50% autour de 450 nm, contre typiquement 80% pour les caméras scientifiques CCD ou sCMOS. Enfin la petite taille des pixels (1,67 µm) ne va pas non plus dans le bon sens. Pour les applications en hématologie, l'appareil de référence est le cytomètre : nous avons donc choisi de positionner le niveau de signal détecté par notre système par rapport à la détection sur un cytomètre (CyAn ADP, Beckman Coulter Inc, USA). Nous avons passé le même échantillon de calibration sur les deux systèmes : l'échantillon Rainbow Calibration Particles RCP-60-5 (Spherotech INC, USA). Il s'agit de billes de diamètre environ 6 µm, contenant un mélange de fluorophores qui permet à ces billes d'être excitées à n'importe quelle longueur d'onde entre 365 et 650 nm. Ces billes présentent 6 niveaux de fluorescence différents. Nous avons réglé le cytomètre dans la configuration permettant de travailler avec le fluorophore FITC (excitation avec laser à 488 nm, filtre à la détection centré à 530 nm, avec une largeur de 40 nm) et dans des conditions de réglages habituelles (gain du PMT fixé à 1). Avec notre montage, pour permettre une comparaison directe, nous avons utilisé pour l'excitation un laser Argon à 488 nm (161C-030, Spectra Physics Lasers, USA), et le même filtre à la détection que pour le cytomètre. Pour optimiser la détection, nous réglons la caméra CMOS avec un temps d'intégration de 1s et un gain analogique de 8,52. Il est à noter que l'éclairement pour l'excitation n'est pas du même ordre de grandeur dans les deux systèmes : dans le cytomètre, le faisceau de puissance 20 mW est focalisé sur une surface inférieure à 0,015 mm², ce qui correspond à un éclairement supérieur à 1 W/mm², alors que dans notre système le faisceau de puissance 25 mW est étalé sur une surface de 650 mm², ce qui correspond à un éclairement inférieur à 0,1 mW/mm². Les résultats obtenus sont présentés figure 2.9. On constate qu'avec notre système,

nous détectons les 3 niveaux de fluorescence les plus importants. Par ailleurs, les pics sont plus étalés, ce qui peut s'expliquer par des inhomogénéités locales dans l'excitation notamment en bord de champ. Vues ces performances, nous pouvons être confiants pour la détection d'échantillon avec un marquage fluorescent efficace. Pour les applications en hématologie, nous pouvons positionner avec le cytomètre le niveau de fluorescence des cellules d'intérêt marquées (globules blancs, plaquettes, réticulocytes) par rapport au niveau de signal des billes (figure 2.10). Avec la sensibilité de notre système, nous pourrons détecter sans problème les globules blancs (ou leucocytes), et nous serons capables de détecter au moins une partie des plaquettes (thrombocytes) et des réticulocytes.

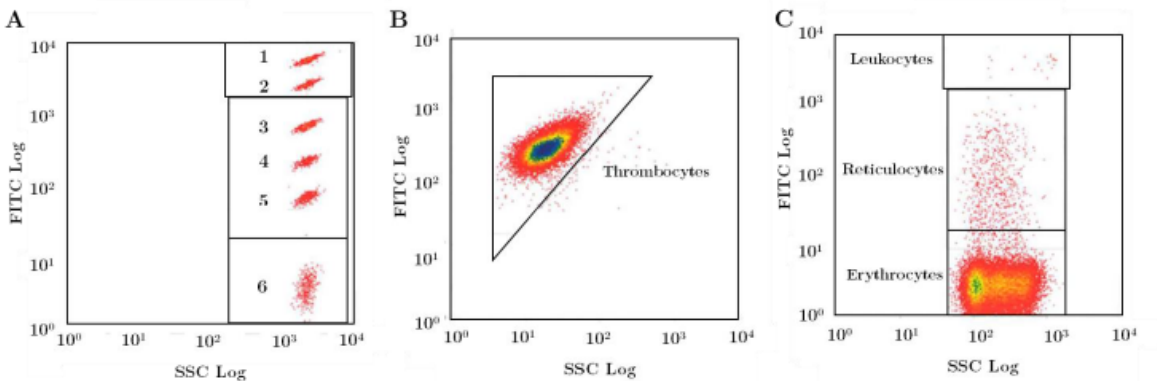

Figure 2.10 : Calibration du niveau de fluorescence des cellules sanguines. Les niveaux de fluorescence des thrombocytes (plaquettes), leucocytes (globules blancs), réticulocytes et érythrocytes (globules rouges) sont comparés avec ceux des billes de calibration sur le cytomètre de référence. Les thrombocytes sont marqués avec anti-CD41a/CD61-FITC (B), et les autres cellules sanguines avec du Thiazole Orange (C).

Intéressons-nous maintenant à une application en hématologie de ce dispositif. Avec nos collègues d'HORIBA, nous avons choisi d'adresser la détection d'un parasite intracellulaire : le *plasmodium falciparum* (l'espèce de plasmodium la plus fréquemment responsable du paludisme chez l'Homme - 99,7 % des cas en Afrique [World Health Organization 2019]). Pour cette application, notre système apportera plus d'informations qu'un cytomètre, et notamment une information spatiale. Le test de diagnostique doit répondre principalement à trois questions : présence ou non de Plasmodium, identification de l'espèce, et mesure de la parasitémie. En complément, une différentiation du stade de maturation du parasite peut être réalisée. Ce parasite peut être marqué en fluorescence avec différents colorants, nous utilisons dans cette étude du Vybrant Green, qui marque les doubles brins d'ADN et qui va donc permettre de marquer l'ADN des parasites. La bimodalité permet à la fois de détecter l'ensemble des globules rouges avec l'image de phase, et de détecter les globules infectés en fluorescence, ce qui donne directement le taux d'infection, ou parasitémie. Le grand champ du système permet d'avoir la statistique pour adresser des parasitémies faibles (peu de globules rouges infectés). La résolution de l'imagerie permet de donner des informations supplémentaires à cette statistique, comme le rejet d'objets fluorescents détectés n'étant pas les cellules d'intérêt (débris ou marquage non spécifique, par exemple des globules blancs) ou des éléments sur le stade du parasite.

Nous avons travaillé avec des parasites de « culture », les échantillons provenant du Laboratoire Dynamique des Interactions Membranaires Normales et Pathologiques de Montpellier. Deux échantillons ont été particulièrement étudiés : le premier (échantillon CP01) comprend du sang avec uniquement des parasites de stade très avancé. La culture est arrêtée 35h après l'infection, les parasites sont au stade appelé « schizonte », avec une taille importante à l'intérieur des globules rouges (cas le plus favorable). L'échantillon CS01 est le même échantillon de sang, mais sain, sans culture de parasite. Le second échantillon (CP02) comprend des parasites à un stade moins avancé, mais plus représentatif des stades effectivement trouvés lors de l'analyse de sang humain. Il s'agit du stade « trophozoïte » qui apparait entre 15 et 18h après l'infection (l'échantillon CS02 correspondant au même sang sain). Ces échantillons sont donc marqués avec le Vybrant Green, et

une dilution au 1/1000 est réalisée pour ne pas avoir une densité de cellules trop importantes sur l'image. Les parasitémies obtenus sont rapportées dans le tableau 2.1. Trois valeurs sont rapportées : celles obtenues avec notre dispositif, celles obtenues avec un cytomètre en flux, et enfin celles obtenues avec la technique de référence reconnue par l'OMS, à savoir l'observation manuelle au microscope.

	Parasitemia		
Sample	***Mesoscope***	**Flow cytometer**	**Manual microscopy**
CP01	5.30 ± 0.01 %	5.57 ± 0.01%	5.16 ± 0.09 %
CS01	0.37 ± 0.13 %	<0.01%	-
CP02	6.31 ± 0.24 %	8.07± 0.08%	7.78 ± 0.08 %
CS02	-	<0.01%	-

Tableau 2.1 : Comparaison de la parasitémie avec trois méthodes : notre système mésoscope, le cytomètre de flux et le comptage manuel.

Notre dispositif présente d'excellentes performances pour le stade le plus avancé (c'est-à-dire les parasites les plus gros, et donc les plus fluorescents). Par contre, nous sous-estimons la parasitémie pour le stade moins avancé. La cause probable est le plus faible niveau de fluorescence de ces stades immatures, en limite de sensibilité de notre système. Des meilleures performances pourraient être obtenues avec un traitement d'image (seuillage) plus évolué que celui utilisé ici. Il est à noter également que des fausses détections ont été faites sur l'échantillon sain. Cela est dû sans doute à la présence de poussières ou débris marqués par le fluorophore, ainsi qu'à la présence de globules blancs qui sont marqués. Là aussi un seuillage plus évolué, avec un tri basé sur la morphologie des zones détectées pourrait sans doute permettre d'améliorer ces performances. Ces études sur la morphologie des zones détectées sont intéressantes à poursuivre, puisqu'elle pourrait aussi renseigner sur le stade du parasite. Dans le cadre des travaux, ce point n'a pas pu être abordé, mais ces études vont continuer chez HORIBA.

Pour améliorer globalement les performances de ce système, quelques développements complémentaires ont été réalisés, et nous allons ici rapidement les citer sans les présenter en détails. Ces développements nous ont permis de faire des preuves de concepts satisfaisantes, mais n'ont pas été utilisés de manière approfondie sur des applications biologiques.
Pour améliorer le produit SBP, nous avons d'une part augmenté le champ de vue total à résolution constante, en augmentant la surface de détection dans le plan image. Faute de capteur sensiblement plus grand avec la même taille de pixels, nous avons déplacé notre capteur dans le plan image (tout le reste du système étant fixe) pour mieux exploiter les performances de l'objectif macro, et se rapprocher du SBP « disponible » représenté sur la figure 2.7. D'autre part, nous avons proposé d'améliorer la résolution à champ de vue constant, en utilisant sur le montage la technique de « super résolution de pixel » développée en sans lentille.
Pour l'imagerie de phase, nous avons proposé d'introduire la méthode utilisant l'équation de transport d'intensité (TIE pour Transport of Intensity Equation [Teague 1983]) pour obtenir des mesures de phase quantitative [Mir 2012]. Par rapport à l'imagerie sans lentille qui utilise l'holographie en ligne, notre montage permet de faire des acquisitions dans le plan de focalisation de l'objet, mais également de part et d'autre de l'objet, ce qui permet d'échantillonner la variation de l'intensité en z. Une fois ces acquisitions réalisées, le formalisme mathématique est relativement simple et bien décrit [Waller 2010], et nous avons utilisé des codes de reconstruction disponibles en « open source » sur internet [Waller 2019]. Une solution originale inspirée du filtre de Wiener a été proposée pour réduire le bruit de type brouillard sur les reconstructions (CO11).
Enfin, la faible complexité du montage permet d'ajouter facilement d'autres sources pour pouvoir imager plusieurs fluorophores travaillant dans des gammes spectrales différentes. Nous avons démontré cette possibilité avec des diodes lasers pour imager des échantillons de cellules fixées U-2 OS (figure 2.11).

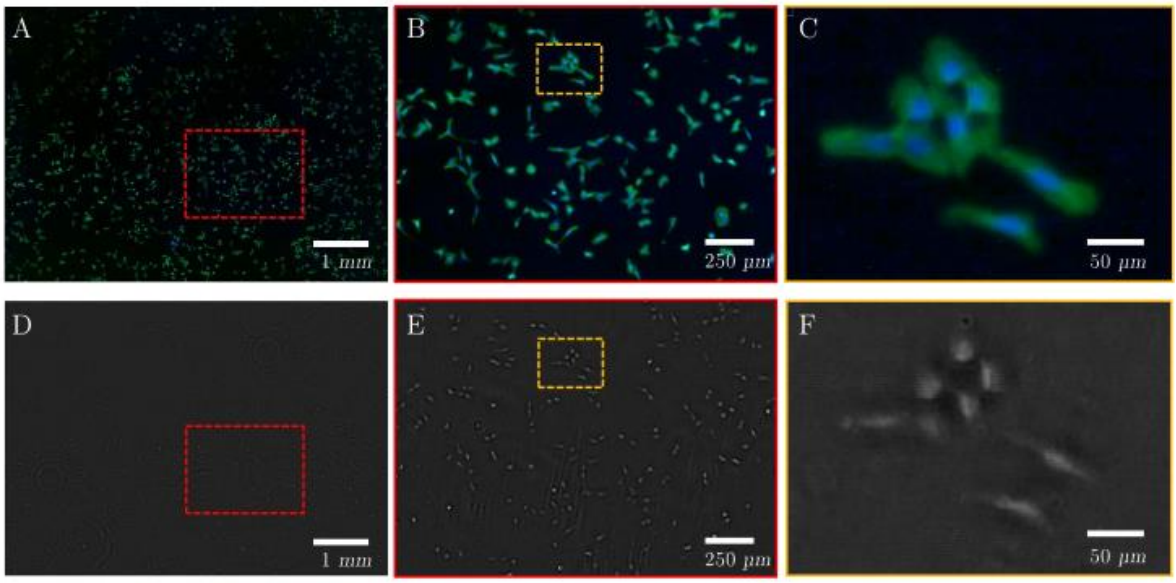

Figure 2.11 : Image grand champ en phase et en fluorescence deux couleurs de cellules U-2 OS (cellules d'ostéosarcome humaines). L'ADN (et donc le noyau) est marqué avec du Hoechst 33342 (diode laser d'excitation à 520 nm, filtre passe-haut à 561 nm pour la détection) représenté en bleu sur la figure, et les filaments d'actine sont marqués avec de l'Alexa Fluor 488 phalloidin (diode laser d'excitation à 405 nm, filtre passe-haut à 461 nm pour la détection) représentée en vert sur la figure. (A B C) Données en fluorescence bicolore présentant une « fusion » des données acquises séquentiellement dans chaque canal spectral. (D E F) Images de phase correspondantes obtenues à l'aide d'une reconstruction holographique à partir d'une seule acquisition avec une défocalisation de 1390 µm. Les images A et D rapportent le champ de vue total. Les rectangles rouges dans A et D correspondent aux images zoomées B et E. Et les rectangles jaunes dans B et E correspondent aux images zoomées C et F.

Ces images terminent la présentation du dispositif d'imagerie bimodal grand champ utilisant un objectif de photographie macro que nous avons développé. Ce dispositif avec un grandissement 1 offre des performances, notamment en termes de champ de vue et de résolution, assez rares. Il continue à être utilisé pour les applications en hématologie qui ont motivé son développement, ainsi que pour d'autres applications en imagerie bimodale grand champ, notamment sur l'étude des neurones.

I.4 - Encadrement

Le développement du montage associant l'imagerie sans lentille holographique avec un objectif à longue distance de travail pour la fluorescence a été réalisé par Matthieu LEROY dans le cadre de son stage de fin d'étude d'école d'ingénieur (2016). Le montage bimodal utilisant l'objectif de photographie macro a été réalisé par Isaure DE KERNIER dans le cadre de sa thèse (soutenue en 2019). Enfin, une partie importante des travaux numériques (non présentés ici) en imagerie sans lentille a été réalisée par Estelle GREMION, jeune diplômée recrutée en CDD que j'ai encadrée dans le projet avec HORIBA Medical (2015-2018).

I.5 - Publications et communications

LISTE DES PUBLICATIONS
Articles publiés dans des revues avec comité de lecture

[A14] LAVABRE T., POLIZOPOULOU Z.S., ISEBE D., CIONI O., REBUFFEL V., BLANDIN P., BOURGES-ABELLA N., TRUMEL C., "Detection of circulating microfilariae in canine EDTA blood using lens-free technology: preliminary results", *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* **33**, p 572-576 (2021)
DOI: 10.1177/10406387211001092

[A13] MANDULA O., KLEMAN J.P., LACROIX F., ALLIER C., FIOLE D., HERVE L., BLANDIN P., KRAEMER D., MORALES S., "Phase and fluorescence imaging with a surprisingly simple microscope based on chromatic aberration", *Optics Express* **28**, p 2079-2090 (2020)
DOI: 10.1364/OE.28.002079

[A12] ALLIER C., HERVE L., MANDULA O., BLANDIN P., USSON Y., SAVATIER J., MONNERET S., MORALES S., "Quantitative phase imaging of adherent mammalian cells: a comparative study", *Biomedical Optics Express* **10**, p 2768-2783 (2019)
DOI: 10.1364/BOE.10.002768

[A11] DE KERNIER I., ALI-CHERIF A., RONGEAT N., CIONI O., MORALES S., SAVATIER J., MONNERET S., BLANDIN P., "Large field-of-view phase and fluorescence mesoscope with microscopic resolution", *Journal of Biomedical Optics* **24**, 036501 (2019)
DOI: 10.1117/1.JBO.24.3.036501

[A10] HERVE L., CIONI O., BLANDIN P., NAVARRO F., MENNETEAU M., BORDY T., MORALES S., ALLIER C, "Multispectral total-variation reconstruction applied to lens-free microscopy", *Biomedical Optics Express* **9**, Issue 11, p 5828-5836 (2018)
DOI: 10.1364/BOE.9.005828

LISTE DES PUBLICATIONS
Articles publiés dans des proceedings ou des revues sans comité de lecture

[P17] DE KERNIER I., RONGEAT N., MORALES S., MONNERET S., BLANDIN P., "Design and evaluation of two imaging systems for very wide field fluorescence microscopy", *Proceedings of SPIE* **11075**, 110750A (2019)
DOI: 10.1117/12.2526938

[P16] ISEBE D., GREMION E., DAYNES A., THOUY B., RONGEAT N., BRESSIEUX S., ALI-CHERIF A., REBUFFEL V., JOLY P., MORALES S., CIONI O., BLANDIN P., "High accuracy platelet counting using lensfree imaging", *Proceedings of SPIE* **11075**, 110750O (2019)
DOI: 10.1117/12.2527008

[P15] DE KERNIER I., BRESSIEUX S., RONGEAT N., ALI-CHERIF A., MORALES S., MONNERET S., BLANDIN P., "Statistical study of blood cell populations by very wide-field bimodal phase/fluorescence imaging", *Proceedings of SPIE* **10885**, 108850A (2019)
DOI: 10.1117/12.2506531

[P14] DELACROIX R., MOREL S., HERVE L., BORDY T., BLANDIN P, DINTEN J.M., DRANCOURT M., ALLIER C., "Lens-free microscopy of cerebrospinal fluid for the laboratory diagnosis of meningitis", *Proceedings of SPIE* **10510**, 105100K (2018)
DOI: 10.1117/12.2289539

[P13] LEROY M., DE KERNIER I., BORDY T., MANDULA O., ALLIER C., DINTEN J.M., MONNERET S., BLANDIN P., "Simultaneous multiscale and bimodal imaging using lensfree microscopy", *Proceedings of SPIE* **10413**, UNSP 104130C (2017)

DOI: 10.1117/12.2285951

[P12] MOREL S.N.A., DELON A., BLANDIN P., BORDY T., CIONI O., HERVE L., FROMENTIN C., DINTEN J.M., ALLIER C., "Wide-Field Lensfree Imaging of Tissue Slides", *Proceedings of SPIE* **9536**, 95360K (2015)
DOI: 10.1117/12.2183462

BREVETS PUBLIES

[B9] BLANDIN P., ALLIER C., DINTEN J.M., CIONI O., HERVE L., JOLY P., « Procédé de caractérisation d'une particule à partir d'un hologramme », Publication n°3090107, 19/06/2020, EP, FR, US, WO

[B8] RONGEAT N., MONNERET S., DE KERNIER I., BLANDIN P., BORDY T., CIONI O., « Dispositif et procédé d'observation d'un échantillon fluorescent par imagerie défocalisée », Publication n°3081552, 29/11/2019, EP, FR, WO

[B7] BLANDIN P., ALI-CHERIF A., ISEBE D., GREMION E., DAYNES A., « Procédé optique d'estimation d'un volume représentatif de particules présentes dans un échantillon », Publication n°3073047, 03/05/2019, FR, US, WO

[B6] SETIER P.A., FOUILLET Y., BLANDIN P., ALI-CHERIF A., COUDERC G., « Dispositif de protection employé dans un système de détection par imagerie sans lentille et système de détection par imagerie sans lentille employant ledit dispositif », Publication n°3060747, 22/06/2018, EP, FR, WO

[B5] BLANDIN P., ALI-CHERIF A., GREMION E., RAIMBAULT S., DAYNES A., CIONI O., « Procédé de numération de particules dans un échantillon par imagerie sans lentille », Publication n°3060746, 22/06/2018, DE, EP, FR, GB, JP, US, WO

[B4] BORDY T., BLANDIN P., CIONI O., « Procédé de formation d'une image haute résolution par imagerie sans lentille », Publication n°3059113, 25/05/2018, EP, FR, US, WO

[B3] ALLIER C., ALI-CHERIF A., BLANDIN P., ESTEBAN G., HERVE L., ISEBE D., "Procédé de caractérisation d'une particule dans un échantillon", Publication n°3049348, 20/09/2017, CN, EP, FR, IN, JP, KR, US, WO

[B2] BLANDIN P., «Procédé d'observation d'un échantillon par imagerie sans lentille », Publication n°3046238, 30/06/2017, CN, DE, EP, FR, GB, IN, JP, KR, US, WO

[B1] ALI-CHERIF A., ALLIER C., BLANDIN P., « Procédé d'analyse de particules », Publication n°3034196, 30/09/2016, CN, EP, FR, IN, JP, KR, US, WO

COMMUNICATIONS À DES CONGRES

[CP19] ISÈBE D., GREMION E., DAYNÈS A., THOUY B., RONGEAT N., BRESSIEUX S., ALI-CHERIF A., REBUFFEL V., JOLY P., MORALES S., CIONI O., BLANDIN P., "High accuracy platelet counting using lensfree imaging", *European Conference on Biomedical Optics (ECBO)*, Munich, Allemagne, Juin 2019

[CP18] DE KERNIER I., RONGEAT N., MORALES S., MONNERET S., BLANDIN P., "Design and evaluation of two imaging systems for very wide field fluorescence microscopy", *European Conference on Biomedical Optics (ECBO)*, Munich, Allemagne, Juin 2019

[CP17] ALLIER C., SAVATIER J., MONNERET S., USSON Y., HERVE L., MANDULA O., BLANDIN P., MORALES S., "Quantitative phase imaging of adherent mammalian cells: a comparison of three different techniques", *Photonics West BIOS*, San Francisco, Etats-Unis, Février 2019

[CP16] I. DE KERNIER, N. RONGEAT, A. ALI-CHERIF, S. MORALES, S. MONNERET, P. BLANDIN, "Statistical study of blood cells population by very wide-field phase/fluorescence imaging", *Photonics West BIOS*, San Francisco, Etats-Unis, Février 2019

[CP15] ALLIER C., DELACROIX R., MOREL S., HERVE L., BORDY T., BLANDIN P, DINTEN J.M., DRANCOURT M., "Lens-free microscopy of cerebrospinal fluid for the laboratory diagnosis of meningitis", *Photonics West BIOS*, San Francisco, Etats-Unis, Janvier 2018

[CP14] LEROY M., DE KERNIER I., BORDY T., MANDULA O., ALLIER C., DINTEN J.M., MONNERET S., BLANDIN P., "Simultaneous multiscale and bimodal imaging using lensfree microscopy", *European Conference on Biomedical Optics (ECBO)*, Munich, Allemagne, Juin 2017

[CP13] MOREL S.N.A., DELON A., BLANDIN P., BORDY T., CIONI O., HERVE L., FROMENTIN C., DINTEN J.M., ALLIER C., "Wide-field lensfree imaging of tissue slides", *European Conference on Biomedical Optics (ECBO)*, Munich, Allemagne, Juin 2014

[CO12] LAVABRE T., POLIZOPOULOU Z.S., ISEBE D., BLANDIN P., CIONI O., REBUFFEL V., BOURGES-ABELLA N., TRUMEL C., "Circulating microfilaria detection in canine EDTA blood using lens-free technology", *European College of Veterinary Clinical Pathology Annual Congress*, Arnhem, Pays-Bas, Septembre 2019

[CO11] I. DE KERNIER, N. RONGEAT, S. MORALES, S. MONNERET, P. BLANDIN, "Wide-field of view quantitative phase imaging", *Focus On Microscopy (FOM)*, Londres, Royaume-Uni, Avril 2019

[CO10] DE KERNIER I., CIONI O., MORALES S., RONGEAT N., ALI-CHERIF A., MONNERET S., BLANDIN P., "Imagerie de phase grand champ de cellules sanguines", *Journées Imagerie Optique Non Conventionnelle*, Paris, France, Mars 2018

[CO9] HERVE L., ALLIER C., BLANDIN P., NAVARRO F., MENNETEAU M., BORDY T., CIONI O., MORALES S., "Multispectral total-variation reconstruction applied to lens-free microscopy", *Biophotonics Congress: Biomedical Optics*, Hollywood, Etats-Unis, Avril 2018

[CO8] ALI-CHERIF A., GREMION E., ISEBE D., DAYNES A., BRESSIEUX S., PAPILLEAU J.L., CIONI O., BORDY T., MORALES S., DINTEN J.M., BLANDIN P., "Towards a disruptive technology in Hematology: lens-free imaging for high precision red blood cell counting and sizing", *International Conference on BioMedical Photonics*, La Grande-Motte, France, Mars 2018

[CA22] ISÈBE D., AMIROUCHE A., PAPILLEAU J.L., PIEDCOQ P., ALESSIO M., VERPLANCK N., BLANDIN P., ALI-CHERIF A., FOUILLET Y., "Reusable microfluidic device for complete blood count applications", *International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (μTAS)*, Bâle, Suisse, Octobre 2019

[CA21] C. ALLIER, J. SAVATIER, S. MONNERET, Y. USSON, O. MANDULA, L. HERVE, P. BLANDIN, S. MORALES, "Quantitative phase imaging of adherent mammalian cells : a comparison of three different techniques", *Quantitative BioImaging Conference (QBI) 2019*, Rennes, France, Janvier 2019

[CA20] I. DE KERNIER, S. MONNERET, P. BLANDIN, "Wide-field, phase and fluorescence imaging – Applications in hematology", *MifoBio 2018*, Seignosse, France, Octobre 2018

[CA19] A. ALI-CHERIF, E. GREMION, D. ISEBE, A. DAYNES, S. BRESSIEUX, J.L. PAPILLEAU, O. CIONI, T. BORDY, S. MORALES, J.M. DINTEN, P. BLANDIN, "Imagerie holographique grand champ pour l'hématologie", *MifoBio 2018*, Seignosse, France, Octobre 2018

[CA18] DE KERNIER I., RONGEAT N., ALI-CHERIF A., MORALES S., MONNERET S., BLANDIN P., "Système d'imagerie phase-fluorescence grand champ", *Horizons de l'Optique*, Toulouse, France, Juillet 2018

II - Un microscope de fluorescence à feuillet de lumière pour travailler dans des cartes microfluidiques

II.1 - Introduction et objectif des travaux

Actuellement les applications de l'ingénierie tissulaire suscitent un intérêt grandissant, qu'il s'agisse des organoïdes ou des organes sur puce. Ces tissus reconstitués permettent de modéliser le développement et/ou le fonctionnement d'un organe dans un contexte normal ou pathologique, ouvrant des perspectives inédites pour la recherche thérapeutique. Ces modèles d'organes, organoïdes [Lancaster 2014] ou organes sur puce, sont obtenus de manière différente [Jackson 2016], mais présentent des caractéristiques communes : ce sont des structures cellulaires tridimensionnelles avec des tailles variant typiquement de 100 µm à plusieurs millimètres.
La visualisation et la caractérisation de ces nouveaux objets biologiques n'est pas évidente puisqu'ils se positionnent en taille et en complexité entre les cultures cellulaires 2D classiques et les organes *in vivo*. Les dispositifs d'imagerie médicale (échographie, IRM, radiographie, …) ne confèrent pas des performances suffisantes, notamment en termes de résolution. A l'opposé, les techniques d'imagerie cellulaire 2D et notamment la microscopie optique classique ne sont pas a priori adaptées à ces échantillons 3D sensiblement plus épais et plus diffusants. Des techniques optiques sont utilisées [Rios 2018], notamment la microscopie de fluorescence confocale ou biphotonique (qui pénètre plus profondément dans l'échantillon), ou la microscopie à feuillet de lumière [Huisken 2004]. Pour réussir à imager assez profondément dans les organoïdes, ces techniques sont souvent associées à de la « transparisation » ou clarification, méthode de préparation sacrificielle de l'échantillon permettant de réduire les chocs d'indice à chaque interface à l'intérieur de l'échantillon [Chung 2013], [Chen 2016].
Dans mon département, nous travaillons plus spécifiquement sur les organes sur puce, en capitalisant sur les compétences, le savoir-faire et les développements technologiques du laboratoire de microfluidique. En effet, l'effervescence autour des organes sur puce a entrainé un certain nombre de développements microfluidiques [Huh 2011]. D'une manière basique, c'est une puce microfluidique qui accueille l'organe, et qui doit permettre d'assurer les flux nécessaires à son maintien en vie et à son fonctionnement. Ces architectures microfluidiques peuvent être couplées à divers capteurs afin d'assurer un suivi de l'organe [Zhang 2017]. Ces architectures ont également un certain nombre de défis à relever [Park 2020], parmi lesquels la vascularisation.

C'est dans ce contexte que notre système de microscopie de fluorescence à feuillet de lumière a été développé. L'application première visée, et pour laquelle notre système a été plus particulièrement conçu, est le suivi de la vasculogénèse. En effet, *in vivo*, la distance moyenne entre une cellule et un capillaire sanguin (diamètre : 8-10 µm) est de l'ordre de 200 µm. Ex vivo, ce développement nécessite le recours à des systèmes microfluidiques (pour perfuser les tissus et contrôler le cisaillement appliqué aux cellules) et des empilements de tissus biologiques complexes afin de mimer la vasculogénèse. Le système développé repose sur le couplage du système d'imagerie à la carte ou au support microfluidique contenant les tissus en cours de formation afin d'obtenir à la fois une caractérisation morphologique des tissus mais également fonctionnelle de l'écoulement des flux dans les tissus (vascularisation). Aussi, notre système s'adapte aux cartes microfluidiques (dimensions, matériaux…) fabriquées au département, et est tout à fait adapté à l'observation de n'importe quel autre objet ou organe à l'intérieur d'une puce.

II.2 - Cadre des travaux et collaborations

Le développement du dispositif de microscopie de fluorescence par feuille de lumière couplé à une carte microfluidique a été réalisé dans le cadre du projet ImVasc (Programme Transversal de Compétences Instrumentation et Détection, CEA). Ce projet a débuté en 2017 pour s'achever en fin d'année 2020. J'ai monté ce projet avec mes collègues Florence RIVERA du laboratoire de microfludique de mon département (CEA/DRT/LETI/DTBS/LSMB), et Marie CARRIERE, biologiste à la Direction de la Recherche Fondamentale du CEA (CEA/DRF/IRIG/DIESE/SYMMES/CIBEST). Toutes deux travaillaient ensemble depuis plusieurs années sur la vasculogénèse.
Ce projet a rejoint toute la dynamique au sein de notre département autour d'un programme structurant DRT / DRF / CHU Grenoble Alpes d'organe sur puce, et plus précisément de pancréas artificiel (projet PANACHE, lancé en 2018). Dans ce cadre, d'autres échantillons ont été observés notamment avec Clément QUINTARD (doctorant du DTBS/LSMB) et Yves FOUILLET (DTBS/LSMB).

II.3 - Principaux résultats

Le dispositif d'imagerie doit permettre une caractérisation morphologique des vaisseaux sanguins en cours de formation dans la carte microfluidique, mais également une caractérisation fonctionnelle de l'écoulement des flux dans ces tissus (vascularisation). Ces objectifs nous permettent de définir le cahier des charges auquel le système doit répondre.
Tout d'abord, la taille des objets à étudier va imposer les performances attendues du système concernant la résolution spatiale. Pour l'observation des vaisseaux, une résolution à l'échelle de la cellule est nécessaire (typiquement 5 µm), mais une résolution subcellulaire est inutile. Pour pouvoir étudier la morphologie de ces vaisseaux, construits en trois dimensions, cette résolution cellulaire est attendue de manière isotrope. Ainsi ces 5 µm vont imposer des contraintes sur l'ouverture numérique de l'objectif d'imagerie pour la résolution latérale, et sur la mise en forme du faisceau excitateur et l'ouverture numérique des optiques utilisées pour générer le feuillet de lumière. Concernant le champ de vue, il est souhaitable de l'étendre pour avoir les informations sur une longueur représentative de capillaire. Là encore cette extension du champ de vue va être liée d'une part au champ de vue accessible grâce à l'objectif utilisé pour l'imagerie, mais d'autre part à la distance sur laquelle le feuillet de lumière se propage en conservant une épaisseur inférieure ou égale à 5 µm.
Ensuite, le dispositif doit pouvoir faire l'image de l'objet biologique d'intérêt qui se situe dans une carte microfluidique. Ce type d'architecture du système d'imagerie n'est pas très répandu. Dans la plupart des cas, en microscopie à feuillet de lumière, un travail assez important doit être réalisé sur l'échantillon pour pouvoir l'adapter au système d'imagerie optique. Ici, c'est l'inverse qui est proposé : adapter la géométrie du microscope à la carte microfluidique dans laquelle l'échantillon est produit et maintenu dans un état fonctionnel. Des couplages de microscope à feuillet de lumière avec des cartes microfluidiques existent dans la littérature : des solutions élégantes intègrent un composant optique tel qu'un miroir ou un prisme [Galland 2015], [Miura 2018], ou une lentille [Paie 2017] dans la carte microfluidique. D'autres équipes utilisent le flux à l'intérieur de la carte microfluidique pour pouvoir déplacer l'objet par rapport au feuillet et ainsi avoir des images de « coupes » de l'échantillon successives [Jiang 2017] [Regmi 2014] [Rasmi 2017].

Ce couplage à la carte microfluidique va imposer d'une part des contraintes d'encombrement mécaniques : les voies d'illumination et de détection vont devoir s'articuler autour de la carte, mais également des tubes, supports… qui permettent le maintien de la carte et la gestion des flux à l'intérieur. D'autre part, ce couplage va également imposer des contraintes optiques : les deux bras (excitation et détection) vont devoir traverser au moins une face de la carte, créant par là-même des problématiques liées au nombre d'interfaces traversées, aux matériaux, ainsi qu'aux angles de ces interfaces (les cartes microfluidiques ont la forme de parallélépipèdes rectangles fins).
Enfin, concernant l'échantillon, nous travaillons avec des cellules marquées avec des fluorophores. Même si nous observons des échantillons qui ont été « modifiés » pour émettre de la fluorescence, l'apport considérable en termes de rapport signal à bruit, de résolution dans les trois dimensions valide ce choix. Par contre, pour permettre un éventuel suivi de la construction des capillaires, et également une analyse fonctionnelle de l'écoulement des flux dans les tissus, il n'est pas envisageable de procéder à une clarification de l'échantillon. Aussi nous sommes pleinement conscients que la diffusion dans l'échantillon va dégrader le feuillet excitateur dans sa direction de propagation, mais également la résolution de la voie d'imagerie dans la profondeur de l'échantillon. La démarche est de proposer un premier montage « basique », de proprement mesurer ses performances et ses limitations pour pouvoir ensuite proposer des améliorations permettant d'atteindre les objectifs fixés.

Pour la conception de notre système, nous avons pu nous appuyer sur la littérature abondante sur le sujet [Girkin 2018], [Olarte 2018], [Power 2017], [Pitrone 2013]. Pour le développement du réseau vasculaire, la carte microfluidique est horizontale. Lors des observations au microscope, pour ne pas détériorer les structures tridimensionnelles en construction ni perturber les flux, il a été décidé de maintenir la carte horizontale. Nous avons opté pour une architecture avec la voie d'excitation et celle de détection du même côté de la carte, sur le modèle de l'iSPIM [Wu 2011]. Mais avec notre carte, les optiques ne pourront venir au plus près de l'échantillon, et pour simplifier le processus d'imagerie, nous avons choisi d'essayer une solution sans adaptation d'indice entre les optiques et l'échantillon (propagation du faisceau d'excitation dans l'air avant d'entrer dans la carte, et travail avec un objectif qui travaille dans l'air).
Sur cette base, des simulations basiques avec un logiciel de conception optique ont été réalisées. Ces simulations ont permis de valider que les choix des optiques pour la mise en forme du feuillet, mais également pour l'imagerie, permettaient d'atteindre les résolutions spatiales attendues et des tailles de champ correctes. Ces calculs ont également permis de s'assurer que, à l'intérieur de la carte, même après avoir traversé les différentes interfaces créées par le capot de la carte, et en présence d'éléments diffusants dans la carte, le feuillet conservait une extension spatiale compatible avec les objectifs visés. Ces simulations ont été associées à l'utilisation du logiciel de conception SolidWorks, pour s'assurer que la réalisation mécanique de la solution était bien possible. Tous ces travaux de conception nous ont permis d'aboutir au plan présenté figure 2.12.

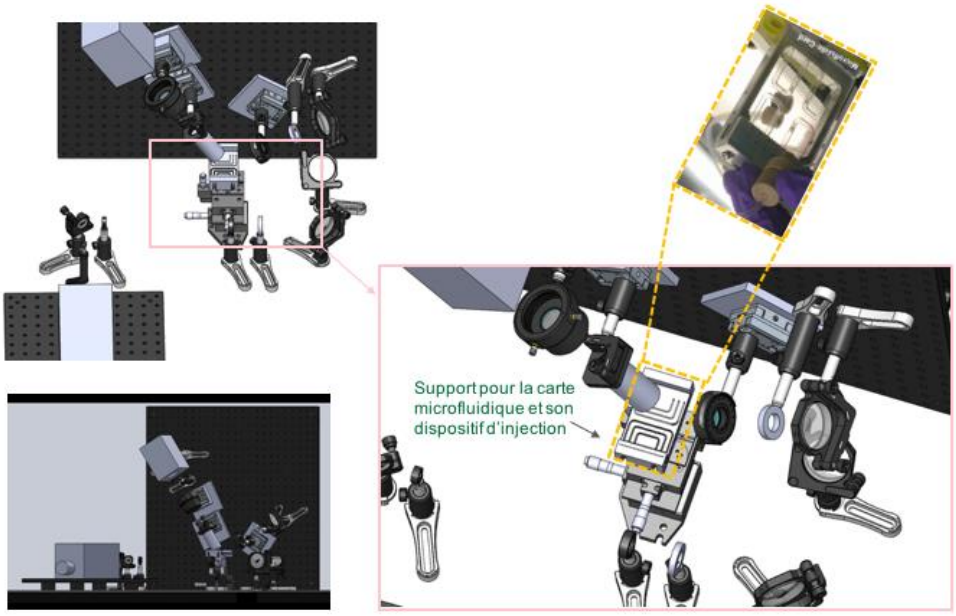

Figure 2.12 : Plan du dispositif obtenu par conception assistée par ordinateur.

Dans cette solution, le faisceau d'un laser Argon à 488 nm (161c-030 Spectra Physics) de diamètre 650 µm est étendu spatialement d'un facteur 16 avec un système afocal composé d'une lentille divergente de focale – 25 mm associée à une lentille convergente de focale 400 mm. Cet agrandissement nous assure que le faisceau va couvrir toute l'ouverture de la lentille cylindrique. Des miroirs de renvoi de 2 pouces permettent de positionner le faisceau sur un support vertical pour définir un axe optique d'illumination à environ 45 degrés de la carte microfluidique placée horizontalement. Sur cet axe, une lentille cylindrique de focale 100 mm génère le feuillet d'excitation. Le signal de fluorescence généré dans l'échantillon est collecté suivant un axe défini lui aussi dans un plan vertical, à 45 degrés de la carte microfluidique, à l'aide d'un objectif 20x d'ouverture numérique 0,28 possédant une très longue distance de travail de 30,5 mm (20X Mitutoyo Plan Apo SL). De cette série d'objectifs à très longue distance de travail, c'est l'objectif proposant le grandissement le plus faible, mais ce dernier est trop important par rapport aux contraintes que nous nous sommes fixées, notamment en termes de champ de vue. Aussi, alors que cet objectif est conçu pour travailler avec une lentille de tube de focale 200 mm, nous avons opté pour une lentille de tube de focale 100 mm (TTL100-A Thorlabs). Le filtrage spectral est réalisé grâce à un filtre interférentiel adapté au fluorophore, positionné entre l'objectif et la lentille de tube. La caméra utilisée est une caméra CMOS scientifique (HPF ORCA FLASH 4.0V3-Pack, Hamamatsu). Dans cette configuration, le bras d'excitation et le bras de détection définissent des axes optiques à 90 degrés dans des plans verticaux. Dans cette première version, il a été décidé que pour réaliser une image tridimensionnelle de l'échantillon, c'est ce dernier qui serait déplacé. Aussi la carte microfluidique et son support spécialement conçu sont fixés à des platines de translation motorisées (ECS3030/Al/NUM/RT et ECSz3030/Al/NUM/RT, Attocube). Une photographie du montage est présentée figure 2.13.

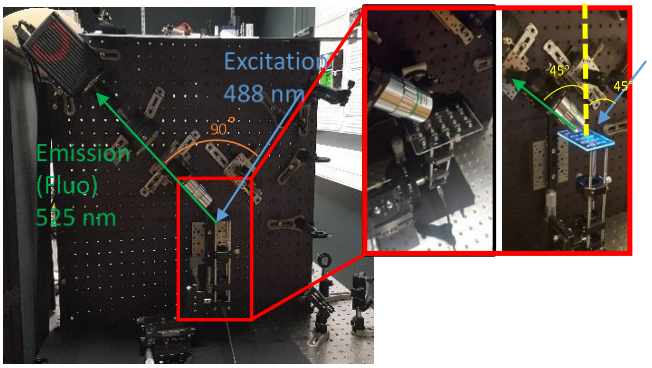

Figure 2.13 : Photographie du premier dispositif réalisé au laboratoire.

La spécificité de ce premier montage réside d'une part dans l'utilisation d'une lentille cylindrique seule, sans association avec un objectif, pour générer le feuillet d'excitation. Ce choix permet de générer le feuillet dans la carte microfluidique à une distance compatible avec son encombrement, tout en ayant un système plus simple, mais il pourra éventuellement être remis en cause pour améliorer les performances. D'autre part, toujours pour des raisons mécaniques, l'objectif utilisé pour l'imagerie a une longue distance de travail, pour pouvoir imager l'intérieur de la carte sans être gêné par son encombrement. Enfin, l'architecture choisie propose des axes optiques appartenant à des plans verticaux pour l'excitation et pour la détection, et elle s'articule autour de la carte microfluidique positionnée horizontalement.

Ce montage a été caractérisé pour évaluer les performances obtenues. Plusieurs axes d'orientation pouvant être utilisés, nous proposons le schéma de la figure 2.14 pour bien les définir.

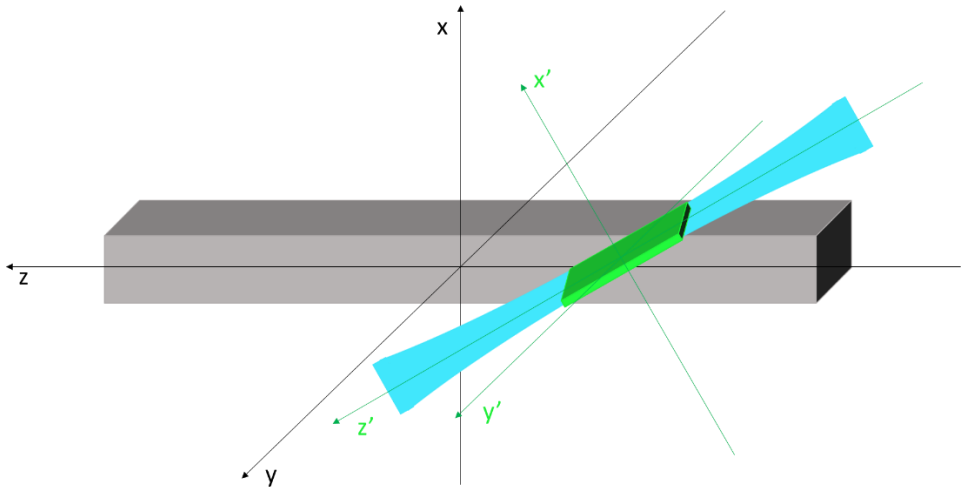

Figure 2.14 : Schéma définissant les axes de référence. Le système (x,y,z) est lié à la carte microfluidique, le système (x'y'z') est lié au feuillet excitateur.

Pour caractériser la voie d'excitation, et plus précisément l'extension spatiale du feuillet, nous avons imagé dans l'air la distribution transverse d'intensité dans différents plans (espacés de 10 µm) suivant la direction de propagation z'. Cette caractérisation est importante puisque l'épaisseur et l'uniformité du feuillet impactent fortement la qualité des images. La figure 2.15 présente le profil du feuillet de lumière dans deux plans (x'z' et x'y'). L'extension latérale du faisceau est de 13 mm dans la direction y', limitée par le diamètre des optiques utilisées sur le trajet.

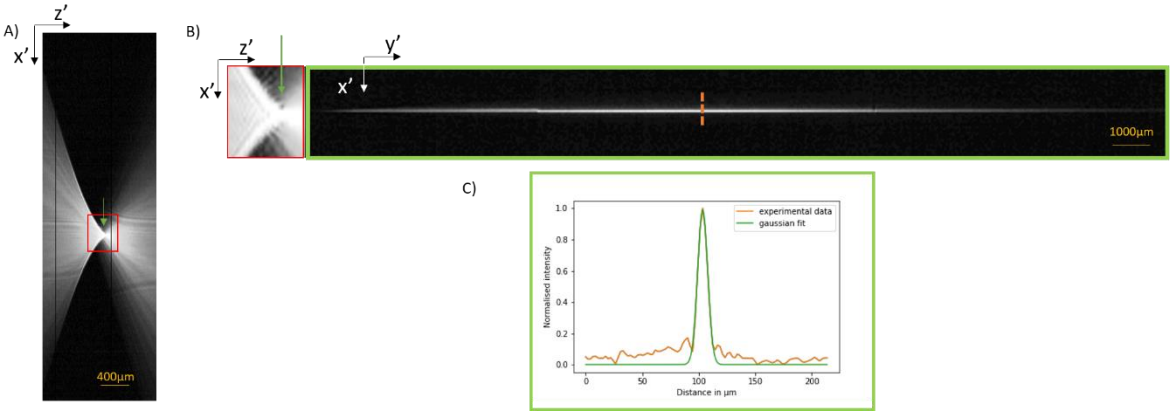

Figure 2.15 : Caractérisation du feuillet de lumière. A) Profil du faisceau dans le plan x'z' sur une distance de propagation de plusieurs mm. Un zoom est réalisé sur la zone délimitée par le rectangle rouge. B) La flèche verte indique le plan de focalisation y'z' dans lequel est observée la répartition d'intensité transverse. C) Moyenne de l'intensité sur la bande centrale de 20 pixels représentée par les pointillés orange. La valeur de largeur à mi-hauteur obtenue avec l'ajustement Gaussien nous permet d'estimer l'épaisseur du faisceau.

Dans la direction de propagation, on peut estimer que l'épaisseur du feuillet est inférieure ou égale à 15 µm sur une distance de propagation de 150 µm autour du plan de focalisation, et inférieure ou égale à 25 µm sur une distance de propagation de 500 µm, ces valeurs étant cohérentes avec les valeurs théoriques obtenues à partir du diamètre du faisceau de col et de la distance de Rayleigh. Ces caractérisations sont intéressantes, mais restent partielles, puisqu'elles ne nous renseignent pas précisément sur l'extension spatiale du feuillet à l'intérieur de la carte. Nous savons que ces dimensions vont être impactées par la traversée de l'interface du capot de la carte, mais surtout par la propagation dans l'hydrogel qui va modifier le front d'onde du faisceau. De telles mesures à l'intérieur de la carte doivent être envisagées.

Nous avons ensuite mesuré les performances de la voie d'imagerie, à l'intérieur d'une chambre microfluidique. Tout d'abord, nous avons mesuré le grandissement effectif obtenu, qui vaut 12. Ainsi la taille totale de la zone de l'échantillon imagée (indépendamment de l'épaisseur du feuillet et des performances de sectionnement optique) est de 12,9*12,9 mm².
Ensuite, nous avons utilisé des billes fluorescentes plus petites que la limite de diffraction pour pouvoir mesurer des réponses percussionnelles ou PSF (billes de 500 nm fluorescentes jaunes-vertes). Ces microbilles étaient diluées dans une solution de gel, injectée dans la chambre microfluidique. Après réticulation du gel, les billes ont été imagées, avec le feuillet excitateur ajusté pour que sa zone la plus fine soit localisée proche du dessus de la chambre. La figure 2.16 illustre ces mesures et l'analyse réalisée. Pour obtenir une valeur de résolution dans le plan y'z', trente PSF de billes individuelles ont été réalisées pour permettre des mesures suffisamment précises et représentatives. Les largeurs à mi-hauteur ont été obtenues sur chaque profil normalisé à l'aide d'un ajustement Gaussien, et nous obtenons une moyenne de 5,2 µm ± 1,1 µm (écart type). En utilisant la même formule que précédemment, à savoir $resolution = 1.19.FWHM(PSF)$, nous obtenons une résolution latérale de 6,2 ± 1,3 µm. Comme prévu, ces valeurs obtenues avec les billes dans l'hydrogel à l'intérieur de la chambre sont plus importantes que celles obtenues avec les mêmes billes déposées sur une lame de verre (largeur à mi-hauteur de 1.6 ± 0.2 µm pour une résolution de 1.9± 0.2 µm). Ceci peut s'expliquer par les aberrations additionnelles introduites par l'utilisation d'un objectif à air à longue distance de travail pour un échantillon en milieu liquide. De plus, l'angle de 45 degrés à l'interface air-chambre ajoute des aberrations dans la direction z' : on remarque que dans cette direction la PSF est plus étendue (figure 2.16 B). L'ajustement Gaussien proposé ne prend pas cette déformation en compte, par conséquent dans cette direction, la résolution peut être considérée comme moins bonne que les valeurs reportées.

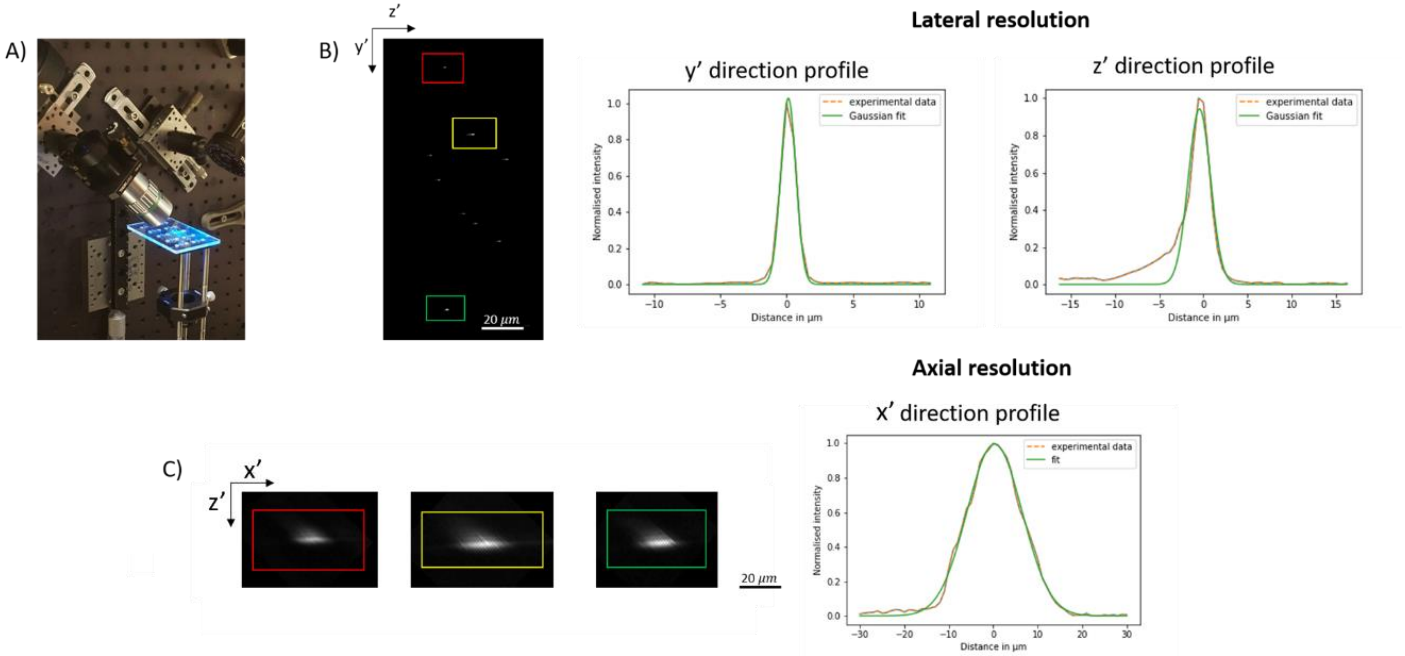

Figure 2.16 : A) Photographie du système et de l'échantillon utilisés pour cette caractérisation. B) Image dans le plan y'z' de la région d'intérêt étudiée, et exemple de profil d'intensité obtenu pour une bille dans les deux directions y' et z' (ajustement Gaussien des profils). C) Reconstruction de la répartition d'intensité dans le plan x'z' pour les 3 billes encadrées dans l'image B, et exemple de profil obtenu dans la direction x'.

Concernant la résolution axiale, des mesures ont été réalisées pour déterminer si cette résolution était définie par l'objectif d'imagerie ou par l'épaisseur du feuillet. Des profils d'intensité suivant l'axe x' ont été mesurés avec les mêmes billes (30), mais en déplaçant l'objectif le long de la direction x' (10 positions espacées de 5 µm) sans déplacer ou modifier le feuillet excitateur. La profondeur de champ obtenue est de 20 ± 1,2 µm (largeur à mi-hauteur de l'ajustement Gaussien). Nous avons ensuite fixé l'objectif et le feuillet excitateur, et mesuré le profil d'intensité en translatant l'échantillon dans la direction x' par pas de 1 µm. Toujours avec un ajustement gaussien, nous obtenons une valeur moyenne de la largeur à mi-hauteur pour les 30 billes de 18,8 ± 2,3 µm. Là encore, à cause des aberrations introduites par la chambre et le gel, les valeurs sont supérieures à celles obtenues avec des billes déposées sur une lame de verre : 15,1 ± 1,4 µm. Ainsi le sectionnement optique provient plutôt de l'épaisseur du feuillet excitateur, mais à l'intérieur de la carte, les aberrations introduites dégradent cette épaisseur. Ceci étant, l'excitation par ce feuillet permet d'avoir des images de « tranches » de l'échantillon sans fluorescence parasite de plans supérieurs ou inférieurs.
In fine, nous pouvons considérer que ces performances spatiales dans les trois dimensions sont obtenues sur un champ de vue effectif de 150 µm (direction z') * 13 mm (direction y').
Ces performances sont intéressantes pour une première version du système. Le fait d'imager à l'intérieur de la carte les dégrade par rapport à ce qui était prévu, mais ces performances restent correctes et nous permettent d'envisager de travailler avec des échantillons biologiques.

Les travaux sur ce système sont toujours en cours, et nous n'avons pour l'instant observé qu'un échantillon biologique d'intérêt (sphéroïde de cellules avec réseau vasculaire en construction). La reconstruction tridimensionnelle de l'échantillon nécessite un travail de traitement des images acquises qui n'a pas encore été mené. Ceci étant, comme notre dispositif a été conçu pour travailler avec le format de cartes microfluidiques développées dans notre département, nous avons pu étudier un système de piégeage dans une carte microfluidique, et analyser la répartition du gel en trois dimensions dans les canaux et la chambre de piégeage.

De nombreuses perspectives existent pour ces travaux. Notre système étant bien caractérisé, il va falloir maintenant le confronter à des échantillons biologiques plus complexes, et repenser certains aspects de cette conception, volontairement basique dans un premier temps, avec pour objectifs d'améliorer les performances au regard de l'application visée. Cette optimisation à venir sera fortement liée aux échantillons étudiés et à la carte microfluidique utilisée.
Nous nous attendons à ce que la diffusion dans l'échantillon dégrade sensiblement les performances. Concernant la voie d'excitation, il est envisagé de jouer sur la création du feuillet de lumière. L'utilisation d'un objectif à longue distance de travail similaire à celui utilisé pour la détection pourrait améliorer la répartition d'intensité du feuillet, en focalisant plus fort l'excitation dans la zone la plus mince du feuillet, ce qui aura pour effet de réduire son épaisseur au foyer, mais qui le fera diverger plus rapidement et donc limitera la surface imagée avec une bonne résolution axiale. Mais cet effet peut être combattu en associant une lentille à focale ajustable, comme une lentille variable électriquement ou ETL (electrically tunable lens), avec le mode de lecture « rolling shutter » de la caméra [Hedde 2016]. On peut également envisager d'utiliser un miroir déformable sur la voie d'excitation pour corriger les déformations du front d'onde induites par l'échantillon. La mise en forme du faisceau pour générer le feuillet pourra aussi être étudiée : des solutions avec des faisceaux de Bessel ou des faisceaux d'Airy existent, mais ce type de solution augmente la complexité du système, et également du traitement numérique associé.
Par ailleurs, l'angle entre les axes optiques définis par la voie d'excitation et le bras de détection n'est pas le même à l'intérieur de la carte. En effet, la réfraction aux différentes interfaces de la carte, et surtout à celle entre l'air et le matériau de la carte avec un choc d'indice relativement important (de 1 à environ 1,5 pour des matériaux polymères) réduit cet angle. Il faudra évaluer dans quelle mesure cela perturbe la mesure, pour éventuellement le corriger en augmentant l'angle entre les deux bras dans l'air.
Ensuite, la détection va souffrir d'astigmatisme, puisque son axe optique ne sera pas normal au capot de la carte. Suivant l'importance de cet astigmatisme, il pourra être envisagé soit de le corriger numériquement, soit d'introduire un élément optique comme un prisme, dont l'une des faces serait normale à l'axe optique, et l'autre au contact optique (avec une huile d'adaptation d'indice) du capot de la carte.
Ces travaux apparaissent comme novateurs dans le domaine des organes sur puce : proposer une solution d'imagerie utilisant les contrastes habituels en fluorescence à l'intérieur d'une carte microfluidique séduit grandement la communauté. Ce premier montage n'est qu'un début, et j'espère pouvoir continuer les développements sur ce chemin dans les années à venir.

II.4 - Encadrement

Toute la conception du système a été réalisée par Federico SANJUAN dans le cadre de son postdoc (Juillet – Décembre 2018). Caroline BISSARDON a ensuite pris le relais (Juillet 2019 – Décembre 2020) pour réaliser le montage, le caractériser et pour adresser la problématique biologique.

II.5 - Publications et communications

LISTE DES PUBLICATIONS
Articles publiés dans des proceedings ou des revues sans comité de lecture

[P18] BISSARDON C., MERMET X., MORALES S., BOTTAUSCI F., CARRIERE M., RIVERA F., BLANDIN P., "Light sheet fluorescence microscope for microfluidic chip", *EPJ Web of Conferences* **238**, 04005 (2020)
DOI: 10.1051/epjconf/202023804005

COMMUNICATIONS À DES CONGRES

[CP22] BISSARDON C., QUINTARD C., MERMET X., MORALES S., BARITAUX J.C., FOUILLET Y., BLANDIN P., "Vascular "Organ-on-chip" imaging: a dedicated single plane illumination fluorescence microscope", *European Conference on Biomedical Optics (ECBO)*, Conférence virtuelle, Juin 2021

[CP21] BISSARDON C., MERMET X., QUINTARD C., FOUILLET Y., MORALES S., BOTTAUSCI F., CARRIERE M., RIVERA F., BLANDIN P., ""Organ-on-chip" specific light sheet fluorescence microscope for vascularization investigation", *Virtual 12th Light Sheet Fluorescence Microscopy Conference 2020*, Virtual conference, Octobre 2020

[CP20] BISSARDON C., MERMET X., MORALES S., BOTTAUSCI F., CARRIERE M., RIVERA F., BLANDIN P., "Light sheet fluorescence microscope for microfluidic chip", *European Optical Society Annual Meeting (EOSAM)*, Online Meeting, Septembre 2020

[CA25] C. QUINTARD, C. LAPORTE, G. JONSSON, C. BISSARDON, A. PITAVAL, A. LEOPOLDI, P. BLADIN, J.L. ACHARD, J.M. PENNINGER, F.P. NAVARRO, Y. FOUILLET, X. GIDROL, "Microfluidic device integrating functional endothelial networks and automatic fluid handling with valves", *International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (μTAS)*, Palm Springs, Etats-Unis, Octobre 2021

[CA24] C. BISSARDON, X. MERMET, C. QUINTARD, Y. FOUILLET, S. MORALES, F. BOTTAUSCI, M. CARRIERE, F. RIVERA, P. BLANDIN, "Organ-On-Chip specific light sheet fluorescence microscope for vascularization investigation", *Virtual 12th Light Sheet Fluorescence Microscopy Conference 2020*, Septembre 2020

[CA23] C. BISSARDON, T. KRAMMER, F. BOTTAUSCI, F. SANJUAN, S. MORALES, M. CARRIERE, F. RIVERA, P. BLANDIN, "In-situ visualisation of complex vascularized tissues in microfluidic organ on chip system", *Fluo Day 2019*, Grenoble, France, Novembre 2019

De l'instrumentation pour… être « embarquée » avec l'échantillon

Dans cette dernière partie, nous allons nous intéresser à des développements de systèmes optiques ayant pour finalité d'être embarqués avec l'échantillon. « Embarqué » signifie ici au plus près de l'échantillon, à son contact ou au contact de son contenant ; cela sous-entend également une notion de déplacement, de suivi de l'échantillon étudié. Dans ces travaux, l'objectif est de réduire la taille des dispositifs pour pouvoir les utiliser sur le terrain, en dehors de laboratoire, tout en conservant des performances optiques intéressantes. Une attention particulière est portée à l'intégration de fonctions optiques dans les supports d'échantillon, et en particulier dans les cartes microfluidiques.

Pour adresser cette problématique, nous proposons d'aller plus loin dans ce chapitre que choisir des éléments optiques en fonction de leurs caractéristiques et de leur coût sur catalogue. Nous essayons de ne pas utiliser les cartes microfluidiques uniquement pour la préparation d'échantillon, ni d'adapter l'architecture optique à cette carte pour tenter de compenser les défauts qu'elle induit, mais bien de faire interagir dans un modèle de co-conception et de co-intégration les fonctions optiques et microfluidiques. Nous rentrons plus ici dans la technologie des composants optiques, afin de les modifier ou d'en proposer des nouveaux qui répondent à nos objectifs. En plus de ces considérations en termes d'architecture et de fonctionnalités, nous nous préoccupons également de la compatibilité avec de l'industrialisation. La voie entrouverte avec l'imagerie holographique sans lentille, qui consiste à utiliser des composants développés pour des marchés « grands publics », et de les détourner pour des usages scientifiques semble de ce point de vue pertinente. En revenant au niveau de la technologie, si on peut s'insérer dans la fabrication industrielle, en récupérant un grand nombre d'étapes du processus de fabrication, on peut avoir un outil à façon, mais compatible avec la production grand public et donc moins cher.

Dans cette partie vont être présentés les premiers travaux sur la réalisation de dispositifs intégrés et ultra compacts pour la lecture et l'imagerie de fluorescence. Nous présenterons également des pistes envisagées pour la suite des travaux sur ces thématiques.

Ces développements présentés sont tirés d'une part par les activités microfluidiques de mon département, le DTBS, et d'autre part par les développements technologiques qui sont réalisés dans le Département Optique et Photonique (DOPT) du LETI. Ces travaux tentent d'utiliser les spécificités du LETI, mon environnement de travail actuel, et sont construits sur les forces et les éléments différentiants que peuvent apporter les technologies qui sortent directement de nos salles blanches, que ce soit en microfluidique ou en optique.

C'est dans cet environnement et cette thématique que je vois aussi mes perspectives de travaux de recherche les plus prometteuses et que je souhaite poursuivre dans les prochaines années. Ce chapitre pose les bases du projet de recherche que je vais poursuivre à court et moyen termes.

I - Des systèmes intégrés et compacts pour la fluorescence

I.1 - Introduction et objectif des travaux

Comme vu précédemment, un des points forts de l'imagerie sans lentille est la compacité et la simplicité de ses dispositifs. Cela permet d'avoir des systèmes facilement transportables pour travailler sur le terrain (analyse de prélèvements environnementaux ou sur des chaines de production), ou dans des environnements contraints, comme à l'intérieur d'un incubateur ou dans l'espace. Sur ce point, on peut d'ailleurs remarquer qu'un des premiers papiers qui a remis au goût du jour l'holographie en ligne sans lentille au début des années 2000, quelques années avant les travaux d'Ozcan, a été co-écrit par des scientifiques de la NASA et proposait le développement d'un microscope pour imager dans l'espace [Lange 2005]. En fluorescence, cette association de compacité et de simplicité ouvrirait également des perspectives dans l'utilisation des dispositifs en dehors des laboratoires, et notamment dans les problématiques de tests au plus près des patients chaque fois que les soins médicaux sont nécessaires (Point of Care) [Vashist 2015]. Une approche qui s'est beaucoup développée ces dernières années est l'utilisation des téléphones portables pour construire des microscopes de fluorescence [Breslauer 2009], [Zhu 2011], [Damodaran 2019] ou des lecteurs de fluorescence [Huang 2019], [Minagawa 2019], [Liang 2019]. En effet ces concentrés de technologies possèdent un ou plusieurs capteurs, des sources lumineuses, des capacités de calculs et des connexions (wifi, bluetooth, réseaux mobiles). Cependant, les propriétés de la caméra et de la lentille souvent mal adaptées à la microscopie sont « subies », et des ajouts de composants optiques sont généralement nécessaires (objectif, source lumineuse externe, filtres spectraux) pour améliorer les performances.
Pour mieux répondre aux contraintes de la microscopie et pour plus de flexibilité dans l'utilisation, des dispositifs associant des composants discrets (source, lentille, filtre, caméra) dans des architectures compactes ont été proposés [Zhang 2015]. Pour aller vers encore plus de compacité, et sur le modèle de l'holographie, des microscopes de fluorescence sans lentille ont été décrits [Sasagawa 2019] [Coskun 2011]. Mais dans ce cas, l'émission de fluorescence étant incohérente, il n'y a pas de reconstruction numérique basée sur les lois de la propagation comme c'est le cas en holographie. L'utilisation de déconvolutions tridimensionnelles assez « brutales » est proposée par certains pour améliorer numériquement la qualité des images, mais les a priori sont tellement forts que sur des échantillons autres que des billes les résultats ne sont pas convaincants [Coskun 2011]. Aussi sur de tels dispositifs sans lentille il faut rapprocher le détecteur le plus possible du plan imagé pour obtenir la meilleure résolution. Des relais optiques comme des plaques de fibre optique (fiber optic plates ou FOP en anglais) peuvent avoir un intérêt pour rapprocher le plan imagé et le détecteur, mais dans ce cas, ce sont eux qui vont limiter la résolution spatiale [Sasagawa 2019]. Un des grands défis dans ces architectures minimalistes est le filtrage spectral nécessaire pour se débarrasser de l'excitation et ne conserver que le signal de fluorescence, typiquement six ordres de grandeur moins intense. Les filtres interférentiels couramment utilisés en microscopie de fluorescence sur la partie collimatée du faisceau entre l'objectif et la lentille de tube, sont extrêmement performants, mais possèdent une forte dépendance angulaire problématique dans une architecture sans optique. Des performances satisfaisantes sont obtenues en les couplant avec des filtres absorbants [Sasagawa 2019], ou en associant une réflexion totale interne de l'excitation à une interface entre l'échantillon et le capteur et un filtre absorbant [Coskun 2011]. Enfin, les diodes organiques (diodes électroluminescentes OLED ou photodiode OPD) apparaissent comme une alternative technologique pertinente pour être intégrées directement dans des cartes microfluidiques contenant des échantillons [Edel 2004], [Williams 2014], [Nakajima 2011].

Dans ce paragraphe vont d'abord être rapportés les principaux développements menés pour développer un microscope de fluorescence sans lentille. Puis, nous introduirons les travaux menés sur l'intégration de sources OLED transparentes sur des cartes microfluidiques pour proposer une détection de signal en épifluorescence.

I.2 - Cadre des travaux et collaborations

Les travaux sur la microscopie de fluorescence sans lentille ont été menés dans le cadre de la thèse d'Isaure DE KERNIER, travaux réalisés en collaboration avec la société HORIBA Medical et l'Institut Fresnel (Serge MONNERET). Les travaux sur les dépôts de filtres ont été réalisés avec l'équipe Recherche en matériaux, composants et technologies de Couches Minces Optiques de l'Institut Fresnel (Julien LUMEAU). La conception et le développement de lecteur de fluorescence compact intégré sur carte microfluidique sont réalisés dans le projet MIMOLED (financement interne CEA-LETI / IPCEI). J'ai monté ce projet en 2018 avec mes collègues du DOPT Benoit RACINE et Etienne QUESNEL, en y associant Nicolas VERPLANCK et l'équipe packaging du laboratoire de microfluidique du DTBS. Ce dernier projet est toujours en cours à l'heure actuelle.

I.3 - Principaux résultats

Pour réaliser un microscope de fluorescence sans lentille (figure 3.1), le premier verrou auquel nous nous sommes intéressés est le filtrage de la lumière d'excitation. Sur la base de l'architecture simple utilisée en holographie sans lentille (microscope en « transmission »), en utilisant des composants commerciaux, nous avons tenté de rajouter un filtre interférentiel.

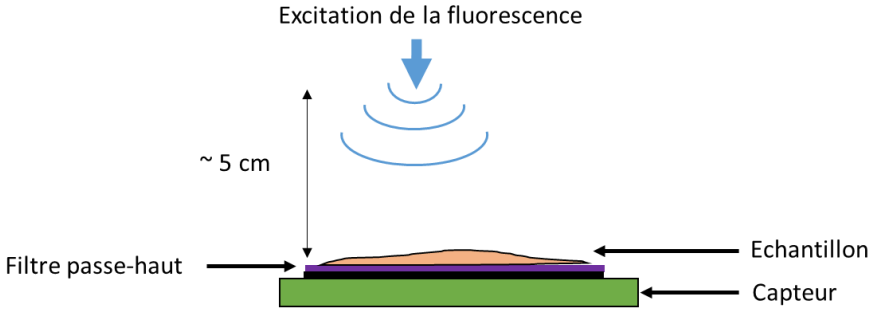

Figure 3.1: Schéma de principe d'un lecteur ou microscope de fluorescence sans lentille.

La première idée a été d'ajouter un filtre sur le seul composant situé après l'échantillon (dans le sens de propagation de la lumière) : le capteur. Ces essais ont été réalisés avec le capteur CMOS vendu par Raspberry dans la V2 de son module caméra : il s'agit du modèle IMX219 de Sony. L'intérêt de ce capteur est multiple : il propose un bon niveau de performances [Pagnutti 2017], des pixels de petite taille (1,12 µm), et un prix extrêmement bas (autour de 10 euros). De plus, dans l'objectif de réaliser un système portable pour travailler en délocalisé, les micro-ordinateurs Raspberry Pi, pour lesquels ce module a été développé, offrent des perspectives intéressantes pour le pilotage du dispositif et pour éventuellement réaliser des étapes de calcul. Cependant, avant de

pouvoir déposer le filtre interférentiel, un travail de préparation du capteur est indispensable. Pour commencer, il est décidé de rapprocher l'échantillon, typiquement contenu dans une chambre microfluidique, le plus possible de la matrice sensible. Il faut donc se débarrasser de l'objectif, du filtre infrarouge situé juste en dessous, et des différents éléments situés à la surface du capteur (figure 3.2). D'autant plus que ces différents éléments ne sont pas du tout adaptés à l'usage que nous souhaitons faire du capteur. Pour commencer, il y a la matrice de microlentilles, permettant de concentrer pour chaque pixel le signal lumineux sur la surface sensible et ainsi maximiser la collection.

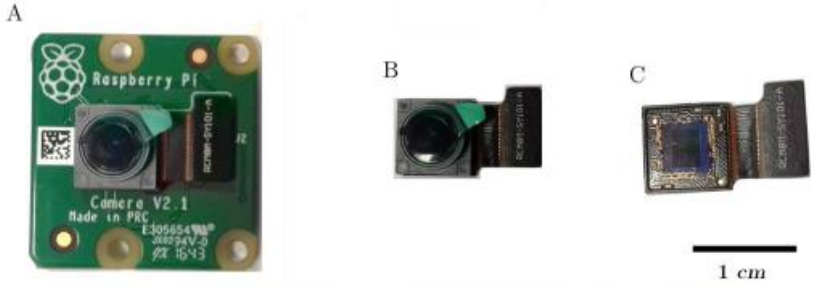

Figure 3.2: (A) Le module caméra Raspberry Pi V2 complet. (B) La caméra seule déconnectée du circuit (étape réversible). (C) La caméra après avoir retiré mécaniquement l'objectif et le filtre infrarouge.

Ce capteur IMX219 est conçu pour travailler sur des systèmes de type smartphone, pour lesquels les lentilles d'imagerie sont de taille comparable voire plus petites que le capteur. Aussi en s'éloignant du centre du capteur, les microlentilles sont de plus en plus décentrées pour collecter les rayons arrivant avec des angles importants, ce qui est gênant dans notre usage en « sans lentille ». Ensuite, il s'agit d'un capteur couleur, qui possède une matrice de Bayer pour séparer les contributions rouge, verte et bleue. Aussi cette matrice de Bayer va induire des pertes pour le signal de fluorescence : la réponse spectrale sera différente suivant la « couleur » des pixels (rouge, vert ou bleu), ce qui va créer des défauts périodiques pour l'image. Le capot de protection est enlevé mécaniquement. La matrice de microlentilles et la matrice de Bayer sont quant à elles fabriquées en matériaux organiques (polymères), ce qui n'est pas le cas de la surface photosensible (silicium). Ainsi un traitement par plasma O_2 permet d'éliminer sélectivement ces deux couches sans endommager le capteur. Des paramètres expérimentaux ont pu être optimisés pour réaliser cette opération avec succès (figure 3.3).

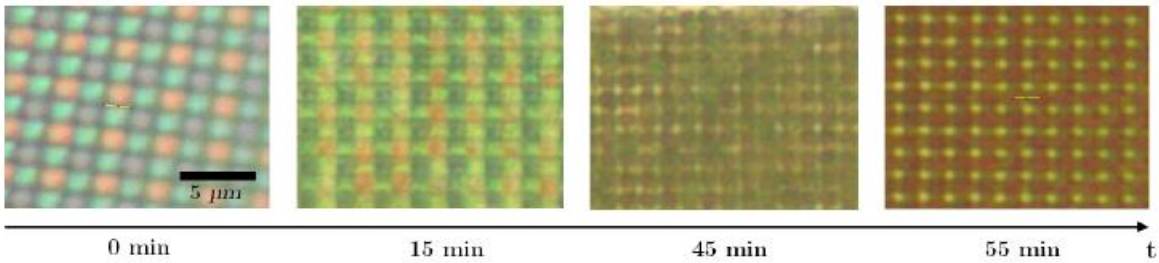

Figure 3.3 : Evolution de la surface du capteur selon le temps d'exposition au plasma.

Après avoir vérifié que ces capteurs « nus » étaient toujours fonctionnels et présentaient les performances attendues, nous avons procédé au dépôt de couches minces pour créer le filtre interférentiel sur la surface. Le filtre conçu est un filtre passe haut avec une coupure à 488 nm, et une densité optique de 6. Il est composé d'un empilement de 70 couches alternant du pentoxyde de niobium (Nb_2O_5) d'indice de réfraction 2,40 à 490 nm, et du dioxyde de silicium (SiO_2) d'indice de réfraction 1,46 à 490 nm. Les performances spectrales mesurées avec cet empilement déposé sur du verre sont en accord avec les attentes. Mais malheureusement, cette approche n'a pas été concluante pour deux raisons principales. Tout d'abord l'état de surface du capteur nu n'était pas satisfaisant (débris, relief), ce qui ne permettait pas au dépôt d'adhérer. Ensuite, après ce traitement, le capteur n'était plus fonctionnel, des charges s'étant accumulées sur le capteur entrainant un

niveau de « noir » extrêmement élevé. Nous pensons que ce phénomène est dû à la machine utilisée pour ce dépôt qui fonctionnait suivant un processus d'évaporation par faisceau d'électrons assisté par plasma (système SYRUS Pro).
Dans le cadre de ces travaux, il était difficile d'aller plus loin concernant la modification du capteur. Il a donc été décidé d'introduire entre le capteur et l'échantillon une plaque de fibres optiques (FOP). Sur la face du dessus de cette plaque, le filtre développé a été déposé. En effet la qualité de surface des faces de ce composant est très bonne, ce qui a permis de s'affranchir du problème d'adhérence du filtre rencontré avec le capteur. Le FOP utilisé possédait un diamètre de cœur de fibre de 3 µm, une surface de 6*4,3 mm² et une épaisseur de 8 mm. L'ajout de ce composant va quelque peu dégrader la résolution en introduisant des « pixels » de 3 µm, mais le confinement de la lumière dans chaque fibre permet d'avoir la même répartition spatiale de fluorescence en entrée et en sortie de FOP, empêchant la fluorescence de s'étaler durant la propagation. L'autre face du FOP a été utilisée pour insérer un filtre coloré jaune qui fonctionne sans dépendance angulaire, afin de filtrer les contributions de l'excitation transmise par le filtre interférentiel. L'association de ces deux filtres n'offre pas des densités optiques suffisantes à la longueur d'onde d'excitation pour réaliser des mesures de fluorescence avec un bon rapport signal à bruit : avec notre faisceau d'excitation non collimaté nous obtenons des valeurs de 3 pour ce rapport signal à bruit. Pour pouvoir valider ce montage en imagerie de fluorescence, il a fallu trouver une solution pour ne pas envoyer directement le signal d'excitation sur le FOP et le détecteur. Un guide d'ondes a été utilisé pour confiner le signal d'excitation, et illuminer l'échantillon uniquement par le champ évanescent à la surface du guide d'ondes, sur le modèle de la microscopie de fluorescence en réflexion totale interne (TIRF). Le composant utilisé est une lame de verre à la surface de laquelle un guide d'ondes planaire multimode a été déposé, et nous avons injecté un laser à 488 nm dans celui-ci. Ainsi l'échantillon doit être déposé sur la surface de la lame de verre possédant le guide d'onde, et cette face est placée au plus près du FOP pour minimiser la distance de propagation de la fluorescence dans l'air. Une photographie du système final est rapportée figure 3.4.

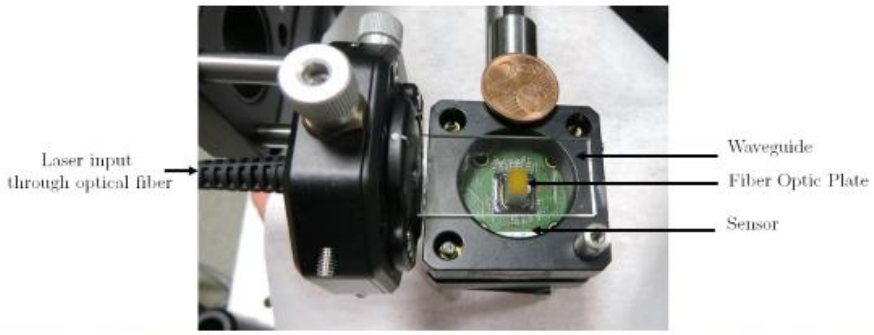

Figure 3.4 : Photographie du microscope TIRF sans lentille.

Dans ces conditions, des images de fluorescence bien contrastées, possédant un rapport signal à bruit intéressant sont obtenues (figure 3.5) sur un large champ (25,2 mm²). Mais la résolution spatiale est relativement mauvaise : elle a été mesurée à 31,5 ± 1,8 µm. Même si les performances semblent en l'état limitées pour faire de la microscopie, une détection d'objets fluorescents avec une localisation spatiale convenable peut être envisagée.

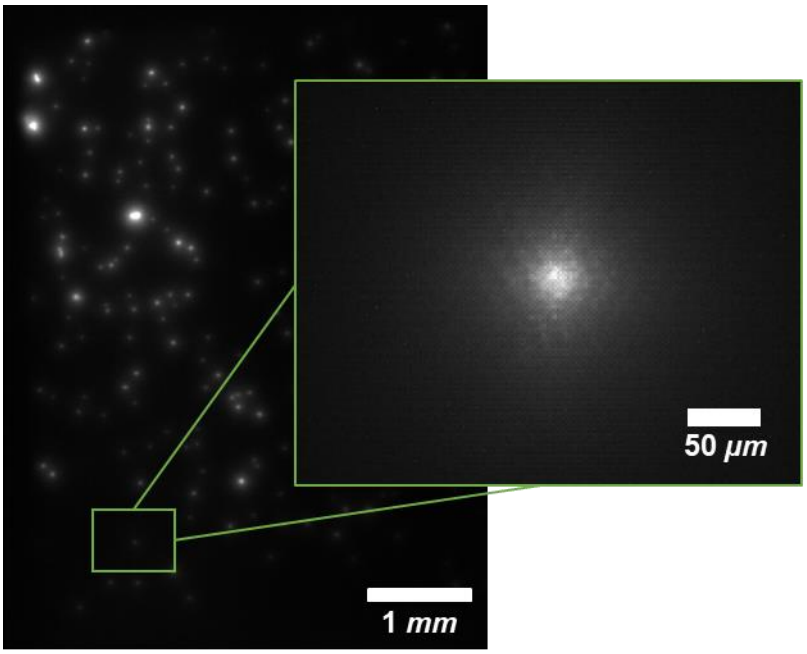

Fig 3.5: Image obtenue avec le microscope compact de fluorescence. L'échantillon observé est constitué de billes fluorescentes de 1 µm marquées à la GFP.

Pour aller vers un système ultra compact, une des limitations de ce microscope, ainsi que des autres solutions proposées dans la littérature, est l'éclairage en « transmission » : la source est du côté de l'échantillon opposé au capteur. Ceci oblige à avoir des composants des deux côtés de l'échantillon, et impose quelques contraintes à ce dernier ou à son support, afin que la lumière puisse le traverser. Or en imagerie de fluorescence, l'émission est quasiment isotrope, donc la direction d'incidence de l'excitation n'a pas d'importance. D'ailleurs la majorité des microscopes de laboratoire fonctionne en épifluorescence, l'excitation et la détection de la fluorescence se faisant du même côté de l'échantillon. Plutôt que d'utiliser ou de modifier des composants existants, nous sommes allés cette fois plus loin dans la technologie en réfléchissant à des nouveaux composants qui permettraient d'assurer un tel fonctionnement. Un composant pertinent serait une source lumineuse transparente, qui émette la lumière d'excitation et qui laisse passer la fluorescence émise par l'échantillon. Avec mes collègues du DOPT, qui travaillent notamment sur les diodes électroluminescentes organiques (OLED), nous avons proposé une architecture de source utilisant les propriétés des OLEDs, et qui puisse être intégrée dans une carte microfluidique. Dans un premier temps nous nous sommes concentrés sur un lecteur de fluorescence, permettant de détecter un niveau de signal, pour valider la pertinence de la solution proposée.
La première spécificité de l'OLED que nous avons utilisée, est la possibilité de réaliser facilement de « gros » pixels. Pour la première version de l'architecture, nous avons envisagé d'utiliser comme capteur une caméra CMOS (identique à celles utilisées en « sans lentille » ou sur le montage du macroscope bimodal, d'une surface de typiquement 30 mm²). Les 10 MPixels nous permettent d'obtenir 10 millions de valeurs, et l'utilisation statistique de toutes ces valeurs (moyenne, écart type…) permet d'avoir une mesure robuste du niveau de signal, même si l'échantillon n'est pas parfaitement homogène sur toute la surface de mesure. Il est tout à fait possible de fabriquer une unique source OLED (pilotée comme un seul pixel) qui mesure 30 mm², même plus. De plus, les deux électrodes de l'OLED peuvent être semi transparentes (par exemple en oxyde d'indium dopé à l'étain ou ITO pour Indium Tin Oxide), ce qui permet de laisser passer le rayonnement de fluorescence. Enfin, il est envisageable de déposer cette source sur différents matériaux (avec un état de surface de qualité suffisante), par exemple le capot de la carte microfluidique, ou le capot de protection du capteur. L'originalité de la source proposée repose sur l'ajout entre l'électrode du côté capteur et le capteur d'une cavité résonnante accordée sur la longueur d'onde d'émission de la

fluorescence (figure 3.6). L'épaisseur L de cette cavité résonnante de type Fabry-Pérot est donnée par la relation :

$$L = \frac{m\lambda}{4n}$$

où λ est la longueur d'onde qui peut sortir de la cavité (ici la longueur d'onde centrale de l'émission de fluorescence), m est un entier généralement égal à 1, et n est l'indice de réfraction du matériau constituant cette cavité. A titre d'exemple, dans le cas où la longueur d'onde de fluorescence est égale à 520 nm, avec un indice de réfraction de la couche intermédiaire de 1,8 (pour du SnO_2), un coefficient m égal à 1, l'épaisseur L est égale à 72 nm. Ainsi la source OLED complète avec la cavité intégrée mesure quelques microns d'épaisseur grand maximum, assurant une grande proximité entre l'échantillon et le capteur.

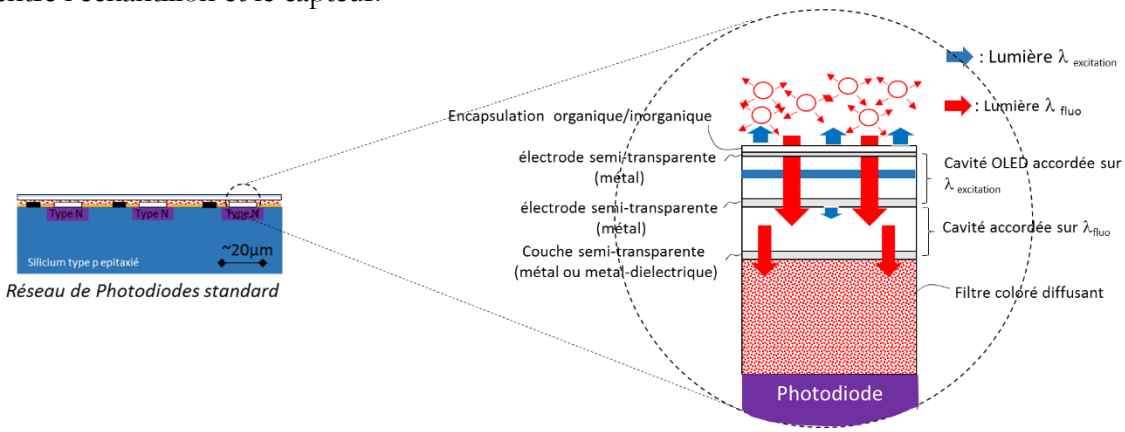

Figure 3.6 : A gauche : schéma de la source OLED déposée à la surface d'un réseau de photodiodes ou capteur matriciel. A droite : zoom sur l'empilement de couches assurant les fonctions visées.

Dans l'idée, l'OLED intégrant cette cavité résonnante serait déposée directement sur le capteur. Mais le facteur de qualité de la cavité, et par conséquent l'efficacité du filtrage spectral et surtout la réjection de la longueur d'onde d'excitation sont une interrogation. Si les performances ne sont pas suffisantes, il est tout à fait possible de superposer différentes cavités successives, ou comme sur le schéma de la figure 3.6 d'ajouter un filtre coloré.

Le plan de travail expérimental a été conçu par étapes. Dans un premier temps, des OLEDs bleues « classiques » sur substrat opaque (silicium) ont été réalisées. Les premières étapes consistent à caractériser le rayonnement émis par ce composant. Le spectre d'émission est rapporté figure 3.7.

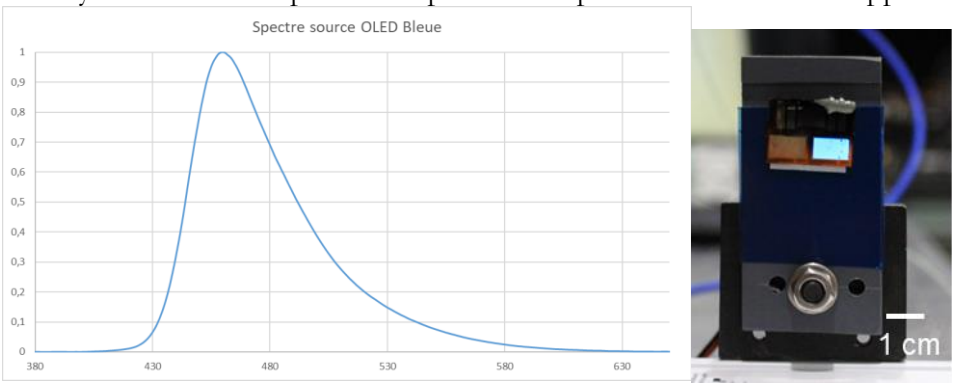

Figure 3.7 : A gauche : spectre des OLED bleues sur substrat opaque. A droite : photographie d'une source OLED opaque.

Comme on le voit, le spectre est en l'état relativement large, avec une asymétrie défavorable à la fluorescence puisque la décroissance est plus faible du côté de l'émission de fluorescence (longueurs d'ondes plus élevées). Ce spectre peut être modifié en jouant sur la structure du composant (cavité de l'OLED, matériau organique choisi, …). Pour démontrer le principe de cette nouvelle architecture, il nous semble acceptable d'utiliser des fluorophores possédant un décalage de Stokes

important (typiquement des quantum dots). Il est également vérifié que le niveau du signal d'émission est suffisant pour exciter un fluorophore. Des tests sont réalisés en utilisant des solutions de fluorescéine : pour ces mesures un filtre à l'excitation est ajouté, et un filtre interférentiel classique est utilisé pour la détection. Différentes dilutions sont testées pour vérifier qu'on peut mesurer des variations du signal. Une fois ces propriétés vérifiées, les premiers composants transparents ont été réalisés (sans cavité). Nous devons maintenant réaliser le même type de caractérisation, mais en récupérant le signal de fluorescence à travers l'OLED. Puis une nouvelle génération d'OLED transparente, intégrant cette fois la cavité filtrante, sera caractérisée de la même façon, et les performances du filtre seront évaluées pour pouvoir ensuite optimiser ses propriétés.
En parallèle, au niveau plus système, des pistes pour intégrer la source OLED directement dans un composant microfluidique sont à l'étude. Différentes stratégies ont été proposées, et en plus de la faisabilité technique, des questions d'usage, comme la réutilisation de certaines parties du système (source ? capteur ? les deux ?) vont nous permettre de faire des choix.
Dans la continuité du projet, il nous semble intéressant d'évaluer un tel système pour l'imagerie. Les performances spatiales (résolution, taille du champ) pourraient être mesurées, et des solutions pour améliorer les performances pourront être proposées.
Nous avons positionné le développement de ces sources originales dans le contexte du diagnostique ou de la détection en utilisant des systèmes microfluidiques, mais des perspectives pour des applications *in vivo*, comme en endoscopie ou en imagerie/détection peropératoire peuvent être envisagées. D'une manière plus générale, tous ces développements sur la miniaturisation de sources, de fonctions optiques, de détecteurs trouvent aussi un écho extrêmement important dans tous les dispositifs portés, souvent aussi connectés, comme les montres ou les bracelets, qui sont utilisés pour le bien être, voire parfois pour des mesures médicales. Dans ces cas, des contraintes comparables pour un usage de terrain existent également.

Les travaux présentés ici sont des premières approches. Les deux difficultés que sont la sélection spectrale de l'émission de fluorescence au détriment de l'excitation, et l'obtention d'une résolution spatiale compatible avec la microscopie sont extrêmement importantes, d'autant plus que le système est compact. Il existe un certain nombre de pistes prometteuses à creuser pour améliorer les performances optiques de ces systèmes compacts, en veillant à conserver un compromis entre la complexité ou le nombre d'éléments optiques et les performances. L'intégration de ces systèmes optiques dans les cartes microfluidiques est également une porte que nous avons entrouverte avec ces travaux, et il y a beaucoup de choses à faire dans ce domaine. Associés à cet usage, le vieillissement et la durée de vie de ces sources devront être étudiés. Ces activités sont pour moi des premières briques, sur lesquelles vont venir s'ajouter de nouvelles dans les prochaines années, pour proposer des systèmes optiques performants, compacts et intégrés dans des cartes microfluidiques.

I.4 - Encadrement

Les travaux sur le microscope de fluorescence sans lentille ont été réalisés par Isaure DE KERNIER dans le cadre de sa thèse. Cette partie plus technologique a été menée en parallèle du développement du « macroscope » qui était le cœur de ses travaux. Les activités sur les OLEDs n'ont pour l'instant pas donné lieu à des travaux de stage, thèse ou postdoc.

I.5 - Publications et communications

LISTE DES PUBLICATIONS
Articles publiés dans des proceedings ou des revues sans comité de lecture

[P17] DE KERNIER I., RONGEAT N., MORALES S., MONNERET S., BLANDIN P., "Design and evaluation of two imaging systems for very wide field fluorescence microscopy", *Proceedings of SPIE* **11075**, 110750A (2019)
DOI: 10.1117/12.2526938

BREVET PUBLIE

[B10] RACINE B., QUESNEL E., BLANDIN P., « Dispositif d'excitation et de détection de photoluminescence», Publication n°3102848, 07/05/2021, EP, FR, US

COMMUNICATIONS À DES CONGRES

[CP17] DE KERNIER I., RONGEAT N., MORALES S., MONNERET S., BLANDIN P., "Design and evaluation of two imaging systems for very wide field fluorescence microscopy", *European Conference on Biomedical Optics (ECBO)*, Munich, Allemagne, Juin 2019

II - Vers l'optofluidique

Commençons par définir le terme : nous entendons ici par optofluidique le domaine technologique et de recherche qui combine des propriétés et des avantages de la microfluidique et de l'optique, et qui intègre des éléments optiques ou photoniques dans des dispositifs microfluidiques.
Ainsi avec l'imagerie sans lentille (en holographie ou en fluorescence) et le microscope de fluorescence à feuillet de lumière, nous avons commencé à toucher du doigt ce domaine. Mais avec ces développements, la microfluidique était utilisée pour la préparation de l'échantillon, son maintien en vie, et nous étions plutôt dans une approche où l'optique devait s'adapter aux contraintes imposées par la microfluidique. Il n'y avait ni intégration de fonction optique dans la carte microfluidique, ni de couplage entre actions optiques et microfluidiques (par exemple une mesure optique enclenche une fonction microfluidique comme un tri, ou bien une action microfluidique comme un changement d'interface entre deux liquides non miscibles par électromouillage entraine une fonction optique, dans ce cas un changement de réfraction et donc une déviation du faisceau).
Avec le développement de la nouvelle source OLED, nous allons un cran plus loin en concevant une source lumineuse pour qu'elle puisse être intégrée dans une carte microfluidique.
Mais dans la suite des travaux, nous aimerions aller encore plus loin sur cette thématique. Encore une fois, l'environnement du LETI semble particulièrement propice à cette approche, en capitalisant sur des technologies maitrisées et parfois différentiantes à la fois en microfluidique au

sein du DTBS, mais également en optique et photonique au sein du DOPT. Nous avons plus précisément en tête deux axes de travaux que nous aimerions voir se concrétiser prochainement :

- L'intégration de fonctions optiques dans la carte microfluidique pour l'imagerie de fluorescence à feuillet de lumière. Comme nous l'avions relevé dans la partie concernant le microscope à feuillet de lumière, des couplages de microscope à feuillet de lumière avec des cartes microfluidiques existent dans la littérature : des solutions élégantes intègrent un composant optique tel qu'un miroir ou un prisme [Galland 2015], [Miura 2018], ou une lentille [Paie 2017] dans la carte microfluidique. Dans ces étapes les échantillons observés n'étaient pas les mêmes que ceux qui nous intéressent, et nous sommes convaincus que des solutions du même genre peuvent être utilisées et modifiées pour être compatibles avec le compromis champ de vue / résolution nécessaire à l'observation des organes sur puce et de leur vascularisation. L'idée est d'utiliser la carte pour la mise en forme du feuillet de lumière (réfraction, réflexion), en y intégrant des composants ou directement dans le matériau de la carte des fonctions optiques, plutôt que de la subir.
- L'optoélectromouillage pour piéger, déplacer des objets à l'échelle microscopique dans des composants microfluidiques. L'idée est ici de proposer des fonctions comparables à celles obtenues avec des pinces optiques, mais en utilisant le phénomène d'électromouillage induit optiquement. Avec cette méthode les champs optiques nécessaires sont bien moins intenses qu'avec les pinces optiques, ce qui réduit considérablement le photodommage et l'échauffement au niveau de l'échantillon pour obtenir des pièges stables. Des performances intéressantes ont été obtenues avec cette approche [Chiou 2003], [Pei 2015] et cette thématique nous semble un excellent terrain pour faire se rencontrer nos technologies microfluidiques et nos technologies optiques et continuer à travailler avec mes collègues du DOPT et du DTBS. Nous venons d'obtenir un financement interne du LETI de deux ans pour explorer cette piste.

Dans l'attente de pouvoir partager dans les prochaines années des résultats sur ces sujets…

Conclusion

Depuis 2005, mes activités de recherche m'ont permis d'aborder différentes thématiques scientifiques autour de l'étude du vivant, avec toujours au coeur de mes contributions l'instrumentation optique. J'ai pu balayer un spectre très large, allant de l'imagerie sans lentille, à la mise en forme d'impulsions lasers térawatt pour la génération de rayons X.

Dans ce manuscrit, je suis revenu sur les principales activités menées durant ces douze dernières années.
Dans une première partie, j'ai présenté les développements instrumentaux autour de sources lasers, pour tenter de repousser les limites actuelles, d'une part sur le front de la production de nanoparticules pour la vectorisation et l'imagerie biomédicale, et d'autre part sur le front de l'interaction fort flux pour générer des sources X adaptées à l'imagerie par contraste de phase.
Dans une seconde partie, je suis revenu sur des dispositifs d'imagerie questionnant le compromis entre champ de vue et résolution. Les systèmes présentés ont été mis au point pour s'adapter à l'étude d'échantillons biologiques spatialement étendus afin d'avoir accès à un nombre statistiquement pertinent de cellules individuelles, ou de pouvoir appréhender l'organisation tridimensionnelles de cellules pour assurer des fonctions biologiques.
Enfin, dans une dernière partie, j'ai décrit les travaux menés pour embarquer l'instrumentation optique au sein de cartes microfluidiques pour la détection et l'imagerie de fluorescence, et j'ai terminé par l'optofluidique, thématique d'intérêt applicatif très fort, et capitalisant sur les développements des salles blanches du LETI.

Toutes les compétences scientifiques que j'ai acquises ont pu l'être grâce au travail d'équipe, et à des interactions extrêmement riches avec des chercheurs, des ingénieurs, des techniciens, possédant des domaines d'expertise variés : les lasers ultracourts, l'interaction laser matière, la microscopie, les composants optiques, le traitement des images, la biologie cellulaire, l'hématologie, la microfluidique…

J'ai effectué le début de ma carrière dans différents organismes de recherche publics, dans des environnements sensiblement différents. Au sein du LP3, unité mixte de recherche du CNRS et de l'Université d'Aix Marseille, j'ai vécu une recherche plutôt tournée vers l'approfondissement des connaissances et la formations des étudiants, à laquelle s'est ajoutée une activité d'enseignement conséquente et une implication forte dans le département de physique. Au LETI, institut de recherche de la Direction de la Recherche Technologique (DRT) du CEA, j'ai vécu une recherche plutôt tournée vers la technologie et le transfert industriel. Bien entendu, ces deux approches ne sont pas exclusives, mais le barycentre n'est pas le même suivant le cadre, et les organismes ne possèdent pas les mêmes forces.

Au cours de ces années, la formation de jeunes chercheurs a toujours eu une place importante, et j'ai eu la chance de travailler avec deux postdoctorants, trois doctorantes et neuf stagiaires. Ce type de collaboration est formateur pour le jeune chercheur, mais aussi pour son encadrant, et permet de faire avancer de manière solide les activités de recherche sur les thèmes abordés. En passant mon HDR je souhaite pouvoir continuer ces activités et transmettre mes compétences, mon expérience et mes conseils à la future génération de chercheurs.

Remerciements

Pour commencer, je remercie sincèrement et chaleureusement les membres du jury : Sophie BRASSELET, Pierre NASSOY et Gilles TESSIER qui ont accepté d'être rapporteurs de mes travaux ; Olivier LIMOUSIN, Olivier UTEZA et Nathalie WESTBROOK qui ont endossé le rôle d'examinateurs, et enfin Emmanuel BOSSY qui a présidé ce jury.

Je souhaite remercier les jeunes chercheurs qui m'ont fait confiance pour leur apprendre de nouvelles choses, pour les former, pour les emmener plus loin : les stagiaires courte durée : Adrien, Aurélie, Charlotte, Stéphanie et Laetitia ; les stagiaires longue durée : Viviane, Adrien (le même), Maxime et Matthieu ; les doctorantes : Ksenia, Yasmina et Isaure ; les postdocs : Federico et Caroline.

Je remercie les collègues expérimentés qui m'ont fait confiance pour intégrer leurs équipes, leurs laboratoires : Marc SENTIS et Philippe DELAPORTE au laboratoire Lasers, Plasmas, Procédés Photoniques (LP3), ainsi que les collègues du Département de Physique et de l'UFR Sciences de l'Université Aix-Marseille II qui m'ont attribué un poste de Maître de Conférences parmi eux en 2009. Ensuite Jean-Marc DINTEN et Jean-Louis AMANS, ainsi que la direction du Département microTechnologies pour la Biologie et la Santé (DTBS), et la direction du LETI qui m'ont recruté en 2014. Plus récemment, je remercie Jean-René LEQUEPEYS qui m'a confié la responsabilité d'un des six programmes structurants portés par la direction du LETI en 2020. Je n'oublie pas Vincent LORIETTE et Benoit DUBERTRET qui m'ont offert ma première expérience en tant que docteur à l'ESPCI en 2008.

La recherche est un travail d'équipe, et j'ai eu la chance de collaborer avec de nombreux collègues au cours de ces seize dernières années, ce qui s'est traduit par un certain nombre d'expériences, de conférences, d'articles : qu'ils en soient ici tous chaleureusement remerciés. Je vais m'attarder ici uniquement sur quelques-uns d'entre eux, qui m'ont beaucoup transmis et qui m'ont permis de grandir. Un grand merci à Patrick GEORGES, Sandrine LEVEQUE-FORT et Frédéric DRUON qui, en tant que directeur et encadrants de thèse m'ont appris à faire mes premiers pas, et qui sont toujours présents. Merci à Olivier UTEZA, Marc SENTIS, Philippe DELAPORTE, Laurent CHARMASSON et à l'ensemble des collègues que j'ai côtoyés à Marseille, au LP3, au département de Physique et à l'UFR Sciences. Merci à Serge MONNERET, collègue de Marseille mais avec qui j'ai travaillé depuis Grenoble. Merci à Yves FOUILLET, Rémi GERBELOT, Patrice CAILLAT, Olivier CIONI, Jean-Marc DINTEN, Pascal MAILLEY et à l'ensemble des collègues du DTBS au LETI (opticiens, numériciens, microfluidiciens, biologistes). Merci à Benoit RACINE, Etienne QUESNEL du DOPT également au LETI.

J'adresse un immense merci à ceux, collègues ou proches, qui m'ont soutenu tout au long de ma démarche pour aboutir à ce manuscrit, et qui m'ont fait part de leurs conseils et de leurs relectures. Ils se reconnaitront ici.

Enfin merci à tous ceux qui manifestent ou manifesteront de l'intérêt pour mes travaux.

Bibliographie

[Adams 2010] Adams D.E., Planchon T.A., Squier J.A., Durfee C.G., « Spatiotemporal dynamics of cross-polarized wave generation », *Optics Letters* **35**, pp 1115-1117 (2010)

[Amendola 2017] Amendola V., Pilot R., Frasconi M., Maragò O.M., Iatì M.A., « Surface plasmon resonance in gold nanoparticles: a review », *J. Phys.: Condens. Matter* **29**, 203002 (2017)

[Alkilany 2009] Alkilany A.M., Nagaria P.K., Hexel C.R., Shaw T.J., Murphy C.J., Wyatt M.D., « Cellular uptake and cytotoxicity of gold nanorods: Molecular origin of cytotoxicity and surface effects », *Small* **5**, pp 701–708 (2009)

[Asplund 2019] Asplund M.C., Johnson J.A., Patterson J.E., « The 2018 Nobel Prize in Physics: optical tweezers and chirped pulse amplification », *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **411**, pp 5001–5005 (2019)

[Azamoum 2018a] Azamoum Y., Clady R., Ferré A., Gambari M., Utéza O., Sentis M., « High photon flux Kα Mo x-ray source driven by a multi-terawatt femtosecond laser at 100 Hz », *Optics Letters* **43**, pp 3574-3577 (2018)

[Azamoum 2018b] Azamoum Y., Tcheremiskine V., Clady R., Ferré A., Charmasson L., Utéza O., Sentis M., « Impact of the pulse contrast ratio on molybdenum Kα generation by ultrahigh intensity femtosecond laser solid interaction », *Scientific Reports* **8**, 4119 (2018)

[Balasubramanian 2010] Balasubramanian S.K., Yang L., Yung L.Y.L., Ong C.N., Ong W.Y., Yu L.E., « Characterization, purification, and stability of gold nanoparticles », *Biomaterials* **31**, pp 9023–9030 (2010)

[Barcikowski 2007] Barcikowski S., Menéndez-Manjón A., Chichkov B.N., Brikas M., Račiukaitis G., « Generation of nanoparticle colloids by picosecond and femtosecond laser ablations in liquid flow », *Appl. Phys. Lett.* **91**, 083113 (2007)

[Beg 2003] Beg F.N., Krushelnick K., Lichtsteiner P., Meakins A., Kennedy A., Kajumba N., Burt G., Dangor A.E., « Table-top X-pinch for x-ray radiography », *Applied Physics Letters* **82**, 4602 (2003)

[Berdeu 2017] Berdeu A., « 3D lens-free imaging of 3D cell culture », Manuscrit de thèse (2017)

[Besner 2007] Besner S., Kabashin A.V., Meunier M.M., « Two-step femtosecond laser ablation-based method for the synthesis of stable and ultra-pure gold nanoparticles in water », *Appl.Phys.A* **88**, pp 269–272 (2007)

[Bishara 2010] Bishara W., Su T.W., Coskun A.F., Ozcan A., « Lensfree on-chip microscopy over a wide field-of-view using pixel super-resolution », *Optics Express* **18**, pp 11181-11191 (2010)

[Blandin 2008] Blandin P., « Développement instrumental pour la microscopie de fluorescence résolue en temps : applications biomédicales », Manuscrit de thèse (2008)

[Born 1999] Born M, Wolf E., *Principles of optics*, Cambridge University Press (1999)

[Bravin 2013] Bravin A., Coan P., Suortti P., « X-ray phase-contrast imaging : from pre-clinical applications towards clinics », *Physics in Medicine & Biology* **58**, pp R1-R35 (2013)

[Breslauer 2009] Breslauer D.N., Maamari R.N., Switz N.A., Lam W.A., Fletcher D.A., « Mobile Phone Based Clinical Microscopy for Global Health Applications », *PLoS ONE* **4**, e6320 (2009)

[Brunel 1987] Brunel F., « Not-so-resonant, resonant absorption », *Physical Review Letters* **59**, pp 52-55 (1987)

[Chen 2016] Chen Y.Y., Silva P.N., Syed A.M., Sindhwani S., Rocheleau J.V., Chan W.C.W., « Clarifying intact 3D tissues on a microfluidic chip for high-throughput structural analysis », *PNAS* **113**, pp 14915–14920 (2016)

[Chichkov 1996] Chichkov B.N., Momma C., Nolte S., von Alvensleben F., Tunnermann A., « Femtosecond, picosecond and nanosecond laser ablation of solids », *Appl. Phys. A* **63**, pp 109-115 (1996)

[Chiou 2003] Chiou P.Y., Moon H., Toshiyoshi H., Kim C.J., Wu M.C., « Light actuation of liquid by optoelectrowetting », *Sensors Actuators A Phys.* **104**, pp 222-228 (2003)

[Chiou 2005] Chiou P.Y., Ohta A.T., Wu M.C., « Massively parallel manipulation of single cells and microparticles using optical images », *Nature* **436**, pp 370-372 (2005)

[Choi 2009] Choi J., Zhang Q., Reipa V., Wang N.S., Stratmeyer M.E., Hitchins V.M., Goering P.L., « Comparison of cytotoxic and inflammatory responses of photoluminescent silicon nanoparticles with silicon micron-sized particles in RAW 264.7 macrophages », *J. Appl. Toxicol.* **29**, pp 52-60, (2009)

[Chung 2013] Chung K., Deisseroth K., « CLARITY for mapping the nervous system », *Nature Methods* **10**, pp 508-513 (2013)

[Coskun 2011] Coskun A.F., Sencan I., Su T.W., Ozcan A., « Lensfree Fluorescent On-Chip Imaging of Transgenic Caenorhabditis elegans Over an Ultra-Wide Field-of-View », *PLoS ONE* **6,** e15955 (2011)

[Daloglu 2018] Daloglu M.U., Luo W., Shabbir F., Lin F., Kim K., Lee I., Jiang J.Q., Cai W.J., Ramesh V., Yu M.Y., Ozcan A., « Label-free 3D computational imaging of spermatozoon locomotion, head spin and flagellum beating over a large volume », *Light: Science & Applications* **7**, 17121, (2018)

[Damodaran 2019] Damodaran K., Crestani M., Jokhun D.S., Shivashankar G.V., « Nuclear morphometrics and chromatin condensation patterns as disease biomarkers using a mobile microscope », *PLoS ONE* **14**, e0218757 (2019)

[Dorchies 2008] Dorchies F., Harmand M., Descamps D., Fourment C., Hulin S., Petit S., Peyrusse O., Santos J.J., « High-power 1 kHz laser-plasma x-ray source for ultrafast X-ray absorption near-edge spectroscopy in the keV range », *Applied Physics Letters* **93**, 121113 (2008)

[Doumy 2004] Doumy G., Quere F., Gobert O., Perdrix M., Martin P., Audebert P., Gauthier J.C., Geindre J.P., Wittmann T., « Complete characterization of a plasma mirror for the production of high contrast ultraintense laser pulses », *Physical Review E* **69**, 026402 (2004)

[Dreaden 2012] Dreaden E.C., Alkilany A.M., Huang X., Murphy C.J., El-Sayed M.A., « The golden age: gold nanoparticles for biomedicine », *Chem. Soc. Rev.* **41**, pp 2740-2779 (2012)

[Dubertret 2002] Dubertret B., Skourides P., Norris D.J., Noireaux V., Brivanlou A.H., Libchaber A., « In Vivo Imaging of Quantum Dots Encapsulated in Phospholipid Micelles », *Science* **298**, pp 1759-1762 (2002)

[Edel 2004] Edel J.B., Beard N.P., Hofmann O., deMello J.C., Bradley D.D.C., deMello A.J., « Thin-film polymer light emitting diodes as integrated excitation sources for microscale capillary electrophoresis », *Lab Chip* **4**, pp 136-140 (2004)

[Erogbogbo 2008] Erogbogbo F., Yong K.T., Roy I., Xu G., Prasad P.N., Swihart M.T., « Biocompatible luminescent silicon quantum dots for imaging of cancer cells », *ACS Nano* **2(5)**, pp 873–878 (2008)

[Fourmaux 2011] Fourmaux S., Corde S., Ta Phuoc K., Lassonde P., Lebrun G., Payeur S., Martin F., Sebban S., Malka V., Rousse A., Kieffer J.C., « Single shot phase contrast imaging using laser-produced betatron x-ray beams », *Optics Letters* **36**, pp 2426-2428 (2011).

[Galland 2015] Galland R., Grenci G., Aravind A., Viasnoff V., Studer V., Sibarita J.B., « 3D high- and superresolution imaging using single-objective SPIM », *Nature Methods* **12**, pp 641-644 (2015)

[Gambari 2020] Gambari M., Clady R., Stolidi A., Utéza O., Sentis M., Ferré A., « Exploring phase contrast imaging with a laser-based Kα x-ray source up to relativistic laser intensity », *Scientific Reports* **10**, 6766 (2020)

[Girkin 2018] Girkin J.M., Carvalho M.T., « The light-sheet microscopy revolution », *Journal of Optics* **20**, 053002 (2018)

[Greenbaum 2012] Greenbaum A., Luo W., Su T.W., Göröcs Z., Xue L., Isikman S.O., Coskun A.F., Mudanyali O., Ozcan A., « Imaging without lenses: achievements and remaining challenges of wide-field on-chip microscopy », *Nature Methods* **9**, pp 889-895 (2012)

[de Groot 2015] de Groot P.J., Biegen J.F., « A new class of wide-field objectives for 3D interference microscopy », *Proc. SPIE 9525, Optical Measurement Systems for Industrial Inspection IX*, 95250N (2015)

[Hatch 2011] Hatch A.C., Fisher J.S., Tovar A.R., Hsieh A.T., Lin R., Pentoney S.L., Yang D.L., Lee A.P., « 1-Million droplet array with wide-field fluorescence imaging for digital PCR », *Lab Chip* **11**, pp 3838–3845 (2011)

[Hedde 2016] Hedde P.N., Gratton E., « Selective Plane Illumination Microscopy with a Light Sheet of Uniform Thickness Formed by an Electrically Tunable Lens », *Microscopy Research and Technique* **81**, pp 924-928 (2016)

[Hong 2011] Hong C., Lee J., Zheng H., Hong S.S., Lee C., « Porous silicon nanoparticles for cancer photothermotherapy », *Nanoscale Res. Lett.* **6**, 321 (2011)

[Horstmeyer 2016] Horstmeyer R., Heintzmann R., Popescu G., Waller L., Yang C., « Standardizing the resolution claims for coherent microscopy », *Nature Photonics* **10**, pp 68-71 (2016)

[Huang 2019] Huang C.H., Park Y.I., Lin H.Y., Pathania D., Park K.S., Avila-Wallace M, Castro C.M., Weissleder R., Lee H., « Compact and filter-free luminescence Biosensor for Mobile in Vitro Diagnoses », *ACS Nano* **13**, pp 11698−11706 (2019)

[Huh 2011] Huh D., Hamilton G.A., Ingber D.E., « From 3D cell culture to organs-on-chips », *Trends in Cell Biology* **21**, pp 745-754 (2011)

[Huisken 2004] HuiskenJ., Swoger J., Del Bene F., Wittbrodt J., Stelzer E.H.K, « Optical Sectioning Deep Inside Live Embryos by Selective Plane Illumination Microscopy », Science 305, pp 1007 – 1009 (2004)

[Intartaglia 2012] Intartaglia R., Barchanski A., Bagga K., Genovese A., Das G., Wagener P., Di Fabrizio E., Diaspro A., Brandi F., Barcikowski S., « Bioconjugated silicon quantum dots from one-step green synthesis », *Nanoscale* **4**, pp 1271–1274, (2012)

[Jackson 2016] Jackson E.L., Lu H., « Three-dimensional models for studying development and disease: moving on from organisms to organs-on-a-chip and organoids », *Integr. Biol.* **8**, pp 672—683 (2016)

[Jiang 2017] Jiang H., Zhu T., Zhang H., Nie J., Guan Z., Ho C.M., Liu S., Fei P., « Droplet-based light-sheet fluorescence microscopy for high-throughput sample preparation, 3-D imaging and quantitative analysis on a chip », *Lab Chip* **17**, pp 2193-2197 (2017)

[Jin 2015] Jin D., Wong D., Li J., Luo Z., Guo Y., Liu B., Wu Q., Ho C.M., Fei P., « Compact Wireless Microscope for In-Situ Time Course Study of Large Scale Cell Dynamics within an Incubator », *Scientific Reports* **5**, 18483 (2015)

[Jullien 2005] Jullien A., Albert O., Burgy F., Hamoniaux G., Rousseau J.P., Chambaret J.P., Augé-Rochereau F., Chériaux G., Etchepare J., Minkovski N., Saltiel S.M., « 10^{-10} temporal contrast for femtosecond ultraintense lasers by cross-polarized wave generation », *Optics Letters* **30**, pp 920-922 (2005)

[Kabashin 2003] Kabashin A.V., Meunier M.M., « Synthesis of colloidal nanoparticles during femtosecond laser ablation of gold in water ». *J. Appl. Phys.* **94**, pp 7941–7943 (2003)

[Kim 2012] Kim S.B, Bae H., Koo K.I., Dokmeci M.R., Ozcan A., Khademhosseini A., « Lens-free imaging for biological applications », *Journal of Laboratory Automation* **17**(1), pp 43–49 (2012)

[Krol 1997] Krol A., Ikhlef A., Kieffer J.C., Bassano D.A., Chamberlain C.C., Jiang Z., Pépin H., Prasad S.C., « Laser-based microfocused x-ray source for mammography : Feasibility study », *Medical Physics* **24**, pp 725-732 (1997)

[Kruer 1985] Kruer W.L., Estabrook K., « $J \times B$ heating by very intense laser light », *Physics of Fluids* **28**, pp 430-432 (1985)

[Kruer 2003] Kruer W.L., *The physics of laser plasma interactions*, Westview Press (2003)

[Lancaster 2014] Lancaster M.A., Knoblich J.A., « Organogenesis in a dish: Modeling development and disease using organoid technologies », *Science* **345**, 1247125 (2014)

[Lange 2005] Lange D., Storment C.W., Conley C.A., Kovacs G.T.A., « A microfluidic shadow imaging system for the study of the nematode *Caenorhabditis elegans* in space », *Sensors and Actuators B* **107**, pp 904–914 (2005)

[Lawaczeck 2005] Lawaczeck R., Arkadiev V., Diekmann F., KrumreyM., « Monochromatic X-rays in Digital Mammography », *Investigative Radiology* **40**, pp 33-39 (2005)

[Lefaudeux 2011] Lefaudeux N., Levecq X., Dovillaire G., Ballesta J., Lavergne E., Sauvageot P., Escolano L., « Development of a new technology of deformable mirror for ultra intense laser applications », *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research A* **653**, pp 164-167, (2011)

[Liang 2019] Liang C., Liu Y., Niu A., Liu C., Li J., Ningd D., « Smartphone-app based point-of-care testing for myocardial infarction biomarker cTnI using an autonomous capillary microfluidic chip with self-aligned on-chip focusing (SOF) lenses », *Lab Chip* **19**, pp 1797-1807 (2019)

[Liu 2019] Liu T., de Haan K., Rivenson Y., Wei Z., Zeng X., Zhang Y., Ozcan A., « Deep learning-based superresolution in coherent imaging systems », *Scientific Reports* **9**, 3926 (2019)

[Lohmann 1996] Lohmann A.W., Dorsch R.G., Mendlovic D., Zalevsky Z., Ferreira C., « Space–bandwidth product of optical signals and systems », *J. Opt. Soc. Am. A.* **13**, pp 470-473 (1996)

[Mafuné 2000] Mafuné F., Kohno J.Y., Takeda Y., Kondow T., « Formation and size control of silver nanoparticles by laser ablation in aqueous solution », *J.Phys.Chem.B* **104**, pp 9111–9117 (2000)

[Mafuné 2001] Mafuné F., Kohno J.Y., Takeda Y., Kondow. T., « Formation of gold nanoparticles by laser ablation in aqueous solution of surfactant », *J. Phys. Chem. B* **105**, pp 5114–5120 (2001)

[Maldonado 2020] Maldonado M.E., Das A., Gomes A.S.L., Popov A.A., Klimentov S.M., Kabashin A.V., « Nonlinear photoacoustic response of suspensions of laser-synthesized plasmonic titanium nitride nanoparticles », *Opt. Lett.* **45**, pp 6695-6698 (2020)

[McConnell 2016] McConnell G., Tragardh J., Amor R., Dempster J., Reid E., Bradshaw Amos W., « A novel optical microscope for imaging large embryos and tissue volumes with sub-cellular resolution throughout. *eLife* **5**, e18659 (2016)

[Michalet 2005] Michalet X., Pinaud F.F., Bentolila L.A., Tsay J.M., Doose S., Li J.J., Sundaresan G., Wu A.M., Gambhir S.S., Weiss S., « Quantum Dots for Live Cells, in Vivo Imaging, and Diagnostics », *Science* **307**, pp 538-544 (2005)

[Minagawa 2019] Minagawa Y., Ueno H., Tabata K.V., Noji H., « Mobile imaging platform for digital influenza virus counting », *Lab Chip* **19**, pp 2678 – 2687 (2019)

[Mir 2012] Mir M., Bhaduri B., Wang R., Zhu R., Popescu G., « Quantitative Phase Imaging », chapter 3 in *Progress in Optics* **57**, Elsevier B.V. (2012)

[Miura 2018] Miura T., Mikami H., Isozaki A., Ito T., Ozeki Y., Goda K., « On-chip light-sheet fluorescence imaging flow cytometry at a high flow speed of 1 m/s », *Biomedical Optics Express* **9**, pp 3424-3433 (2018)

[Momose 2005] Momose A., « Recent advances in x-ray phase imaging », *Japanese Journal of Applied Physics* **44**, pp 6355-6367 (2005)

[Nakajima 2011] Nakajima H., Okuma Y., Morioka K., Miyake M., Hemmi A., Tobita T., Yahiro M., Yokoyama D., Adachi C., Soh N., Nakano K., Xue S., Zeng H., Uchiyama K., Imato T., « An integrated enzyme-linked immunosorbent assay system with an organic light-emitting diode and a charge-coupled device for fluorescence detection », *J. Sep. Sci.* **34**, pp 2906–2912 (2011)

[Neddersen 1993] Neddersen J., Chumanov G., Cotton T.M., « Laser ablation of metals: A new method for preparing SERS active colloids », *Appl. Spectrosc.* **47**, pp 1959–1964 (1993)

[Nichols 2006] Nichols W.T., Sasaki T., Koshizaki N., « Laser ablation of a platinum target in water. I. Ablation mechanisms », *J. Appl. Phys.* **100**, 114911 (2006)

[Nirwan 2021] Nirwan V.P., Filova E., Al-Kattan A., Kabashin A.V., Fahmi A. « Smart Electrospun Hybrid Nanofibers Functionalized with Ligand-Free Titanium Nitride (TiN) Nanoparticles for Tissue Engineering », *Nanomaterials* **11**, 519 (2021)

[Olarte 2018] Olarte O.E., Andilla J., Gualda E.J., Loza-Alvarez P., « Light-sheet microscopy: a tutorial », *Advances in Optics and Photonics* **10**, pp 111-179 (2018)

[Orth 2014] Orth A., Crozier K. B., « High throughput multichannel fluorescence microscopy with microlens arrays ». *Optics Express* **22**, 18101 (2014)

[Paganin 2004] Paganin D., Barty A., McMahon P.J., Nugent K.A., « Quantitative phase-amplitude microscopy III. The effects of noise », *Journal of Microscopy* **214**, pp 51-61 (2004).

[Pagnutti 2017] Pagnutti M.A., Ryan R.E., Cazenavette G.J., Gold M.J., Harlan R., Leggett E., Pagnutti J.F., « Laying the foundation to use Raspberry Pi 3 V2 camera module imagery for scientific and engineering purposes », *J. of Electronic Imaging* **26**, 013014 (2017)

[Paie 2017] Paie P., Bragheri F., Claude T., Osellame R., « Optofluidic light modulator integrated in lab-on-a-chip », *Optics Express* **25**, pp 7313-7323 (2017)

[Pang 2013] Pang S., Han C., Erath J., Rodriguez A., Yang C. « Wide field-of-view Talbot grid-based microscopy for multicolor fluorescence imaging », *Optics Express* **21**, pp 14555-14565 (2013)

[Park 2003] Park S.C., Park M.K., Kang M.G., « Super-Resolution Image Reconstruction: A Technical Overview », *IEEE Signal Processing Magazine* **20**, pp. 21-36 (2003)

[Park 2009] Park J.H., Gu L., von Maltzahn G., Ruoslahti E., Bhatia S.N., Sailor M.J., « Biodegradable luminescent porous silicon nanoparticles for in vivo applications », *Nature Mater.* **8**, pp 331-336 (2009)

[Park 2020] Park D.Y., Lee J., Chung J.J, Jung Y., Kim S.H., « Integrating Organs-on-Chips: Multiplexing, Scaling, Vascularization, and Innervation », *Trends in Biotechnology* **38**, pp 99-112 (2020)

[Pei 2015] Pei S.N., Valley J.K., Wang Y.L., Wu M.C., « Distributed Circuit Model for Multi-Color Light-Actuated Opto-Electrowetting Microfluidic Device » *J Light Technol.* **33**, pp 3486-3493 (2015)

[Pitrone 2013] Pitrone P.G., Schindelin J., Stuyvenberg L., Preibisch S., Weber M., Eliceiri K.W., Huisken J., Tomancak P., « OpenSPIM: an open-access light-sheet microscopy platform », *Nature Methods* **10**, pp 598-599 (2013)

[Power 2017] Power R.M, Huisken J., « A guide to light-sheet fluorescence microscopy for multiscale imaging », *Nature Methods* **14**, pp 360-373 (2017)

[Rasmi 2017] Rasmi C.K., Padmanabhan S., Shirlekar K., Rajan K., Manjithaya R., Singh V, Mondal P.P., « Integrated light-sheet imaging and flow-based enquiry (iLIFE) system for 3D in-vivo imaging of multicellular organism », *Appl. Phys. Lett.* **111**, 243702 (2017)

[Regmi 2014] Regmi R., Mohan K., Mondal P.P., « High resolution light-sheet based high-throughput imaging cytometry system enables visualization of intra-cellular organelles », *AIP Advances* **4**, 097125 (2014)

[Rios 2018] Rios A.C., Clevers H., « Imaging organoids: a bright future ahead », *Nature Methods* **15**, pp 24-26 (2018)

[Roy 2016] Roya M., Jina G., Pan J.H., Seo D., Hwang Y., Oh S., Lee M., Kim Y.J., Seo S., « Staining-free cell viability measurement technique using lens-freeshadow imaging platform », *Sensors and Actuators B* **224**, pp577–583 (2016)

[Roy 2017] Roy M., Seo D., Oh S., Yang J.W., Seao S., « Review of recent progress inlens-free imaging and sensing », *Biosensors and Bioelectronics* **88** pp 130-143 (2017)

[Saghafi 2014] Saghafi S., Becker K., Hahn C., Dodt H.U., « 3D-ultramicroscopy utilizing aspheric optics », *J. Biophotonics* **7**, pp 117–125 (2014)

[Sasagawa 2019] Sasagawa K., Ohta Y., Kawahara M., Haruta M., Tokuda T., Ohta J., « Wide field-of-view lensless fluorescence imaging device with hybrid bandpass emission filter », *AIP Advances* **9**, 035108 (2019)

[Scholz 2019] Scholz G., Mariana S., Dharmawan A.B., Syamsu I., Hörmann P., Reuse C., Hartmann J., Hiller K., Prades J.D., Wasisto H.S., Waag A., « Continuous live-cell culture imaging and single-cell tracking by computational lensfree LED microscopy », *Sensors* **19**, 1234 (2019)

[Semaltianos 2010] Semaltianos N.G., Logothetidis S., Perrie W., Romani S., Potter R.J., Edwardson S.P., French P., Sharp M., Dearden G., Watkins K.G., « Silicon nanoparticles generated by femtosecond laser ablation in a liquid environment », *J.Nanopart.Res.* **12**, pp 573–580 (2010)

[Seo 2010] Seo S., Isikman S.O., Sencan I., Mudanyali O., Su T.W., Bishara W., Erlinger A., Ozcan A., « High-Throughput Lens-Free Blood Analysis on a Chip », *Anal. Chem.* **82**, pp 4621–4627 (2010)

[Siders 1999] Siders C.W., Cavalleri A., Sokolowski-Titen K., Toth Cs., Guo T., Kammler M., Horn von Hoegen M., Wilson K.R., von der Linde D., Barty C.P.J., « Detection of nonthermal melting by ultrafast X-ray diffraction », *Science* **286**, pp 1340-1342 (1999)

[Simakin 2001] Simakin A.V., Voronov V.V., Shafeev G.A., Brayner R., Bozon-Verduraz F., « Nanodisks of Au and Ag produced by laser ablation in liquid environment », *Chem.Phys.Lett.* **348**, pp 182–186 (2001).

[Singh 2018] Singh P., Pandit S., Mokkapati V.R.S.S., Garg A., Ravikumar V., Mijakovic I., « Gold Nanoparticles in Diagnostics and Therapeutics for Human Cancer », *Int. J. Mol. Sci.* **19**, 1979 (2018)

[Sobhan 2010] Sobhan M.A., Ams M., Withford M.J., Goldys E.M., « Ultrafast laser ablative generation of gold nanoparticles: The influence of pulse energy, repetition frequency and spot size », *J. Nanopart. Res.* **12**, pp 2831–2842 (2010)

[Sokolowski-Tinten 2001] Sokolowski-Tinten K., Blome C., Dietrich C., Tarasevitch A., Horn von Hoegen M., von der Linde D., Cavalleri A., Squier J., Kammler M., « Femtosecond X-Ray Measurement of Ultrafast Melting and Large Acoustic Transients », *Physcial Review Letters* **87**, 225701 (2001)

[Strickland 1985] Strickland D., Mourou G., « Compression of amplified chirped optical pulses », *Optics Communications* **56**, pp 219-221 (1985)

[Sylvestre 2005] Sylvestre J.P., Kabashin A.V., Sacher E., Meunier M.M., « Femtosecond laser ablation of gold in water: Influence of the laser-produced plasma on the nanoparticle size distribution », *Appl. Phys. A* **80**, pp 753-758 (2005)

[Tasciotti 2008] Tasciotti E., Liu X., Bhavane R, Plant K., Leonard A.D., Price B.K., Cheng M.M.C., Decuzzi P., Tour J.M., Robertson F., Ferrari M., « Mesoporous silicon particles as a multistage delivery system for imaging and therapeutic applications », *Nature Nanotechnol.* **3**, pp 151–157 (2008)

[Teague 1983] Teague M.R., « Deterministic phase retrieval : a Green's function solution », *J. Opt. Soc. Am.* **73**, pp 1434-1441 (1983)

[Tian 2015] Tian L., Liu Z., Yeh L.H., Chen M., Zhong J., Waller L., « Computational illumination for high-speed in vitro Fourier ptychography microscopy », *Optica* **2**, pp 904-911 (2015)

[Timoshenko 2006] Timoshenko V.Y., Kudryavtsev A.A., Osminkina L.A., Vorontsov A.S., Ryabchikov Y.V., Belogorokhov I.A., Kovalev D., Kashkarov P.K., « Silicon nanocrystals as photosensitizers of active oxygen for biomedical applications », *JETP Lett* **83**, pp 423-426 (2006)

[Toth 2007] Toth R., Fourmaux S., Ozaki T., Servol M., Kieffer J.C., Kincaid R.E., Krol A., « Evaluation of ultrafast laser-based hard X-ray sources for phase-contrast imaging », *Physics of Plasmas* **14**, 053506 (2007)

[Vashist 2015] Vashist S.K., Luppa P.B., Yeo L.Y., Ozcan A., Luong J.H.T « Emerging Technologies for Next-Generation Point-of-Care Testing », *Trends in Biotechnology* **33**, p 692-705 (2015)

[Vines 2019] Vines J.B., Yoon J.H., Ryu N.E., Lim D.J., Park H., « Gold Nanoparticles for Photothermal Cancer Therapy », *Front. Chem.* **7**, 167 (2019)

[Wagener 2010] Wagener P., Schwenke A., Chichkov B.N., Barcikowski S., « Pulsed laser ablation of zinc in tetrahydrofuran: Bypassing the cavitation bubble », *J. Phys. Chem. C* **114**, pp 7618-7625 (2010)

[Waller 2010] Waller L., « Computational phase imaging based on intensity transport », *PhD Thesis*, Massachusetts Institute of Technology (2010)

[Waller 2019] Site du laboratoire de Laura Waller à Berkeley : Computational Imaging Lab : http://www.laurawaller.com/

[Wenz 2015] Wenz J., Schleede S., Khrennikov K., Bech M., Thibault P., Heigoldt M., Pfeiffer F., Karsch S., « Quantitative X-ray phase-contrast microtomography from a compact laser-driven betatron source », *Nature Communications* **6**, 7568 (2015)

[Wilkins 1996] Wilkins S.W., Gureyev T.E., Gao D., Pogany A., Stevenson A.W., « Phase-contrast imaging using polychromatic hard X-rays », *Nature* **384**, pp 335-338 (1996)

[Williams 2014] Williams G., Backhouse C., Aziz H., « Integration of Organic Light Emitting Diodes and Organic Photodetectors for Lab-on-a-Chip Bio-Detection Systems », *Electronics* **3**, pp 43-75 (2014)

[World Health Organization 2019] World Malaria Report 2019

[Wu 2011] Wu Y., Ghitani A, Christensen R., Santella A., Du Z., Rondeau G., Bao Z., Colón-Ramos D., Shroff H., « Inverted selective plane illumination microscopy (iSPIM) enables coupled cell identity lineaging and neurodevelopmental imaging in Caenorhabditis elegans », *PNAS* **108**, pp 17708–17713 (2011)

[Wu 2018] Wu Y., Ozcan A., « Lensless digital holographic microscopy and its applications in biomedicine and environmental monitoring », *Methods* **136**, pp 4-16 (2018)

[Wu 2019] Wu Y., Ali M.R.K., Chen K., Fang N., El-Sayed M.A., « Gold nanoparticles in biological optical imaging », *Nano Today* **24**, pp 120–140 (2019)

[Zhang 2015] Zhang Y.S., Ribas J., Nadhman A., Aleman J., Selimović S., Lesher-Perez S.C., Wang T., Manoharan V., Shin S.R., Damilano A., Annabi N., Dokmeci M.R., Takayama S., Khademhosseini A., « A cost-effective fluorescence mini-microscope for biomedical applications », *Lab Chip* **15**, pp 3661-3669 (2015)

[Zhang 2017] Zhang Y.H., Aleman J., Shin S.R., Kilic T., Kim D., Shaegh S.A.M., Massa S., Riahi R., Chae S., Hu N., Avci H., Zhang W., Silvestri A., Nezhad A.S., Manbohi A., De Ferrari F., Polini A., Calzone G., Shaikh N, Alerasool P., Budina E., Kang J., Bhise N., Ribas J., Pourmand A., Skardal A., Shupe T., Bishop C.E., Dokmeci M.R., Atala A., Khademhosseini A., « Multisensor-integrated organs-on-chips platform for automated and continual in situ monitoring of organoid behaviors », *PNAS* **12**, E2293 – E2302 (2017)

[Zhang 2018] Zhang Y., Koydemir H.C., Shimogawa M.M., Yalcin S., Guziak A., Liu T., Oguz I., Huang Y., Bai B., Luo Y., Wei Z., Wang H., Bianco V., Zhang B., Nadkarni R., Hill K., Ozcan A., « Motitlity-based label-free detection of parasites in bodily fluids using holographic speckle », *Light: Science & Applications* **7**, 108 (2018)

[Zhigilei 2009] Zhigilei L.V., Lin Z., Ivanov D.S., « Atomistic modeling of short pulse laser ablation of metals: connections between melting, spallation, and phase explosion », *J. Phys. Chem. C* **113**, pp 11892–11906 (2009)

[Zhu 2011] Zhu H., Mavandadi S., Coskun A.F., Yaglidere O., Ozcan A., « Optofluidic Fluorescent Imaging Cytometry on a Cell Phone », *Anal. Chem.* **83**, pp 6641–6647 (2011)

Production scientifique

LISTE DES PUBLICATIONS
Articles publiés dans des revues avec comité de lecture

[A14] LAVABRE T., POLIZOPOULOU Z.S., ISEBE D., CIONI O., REBUFFEL V., BLANDIN P., BOURGES-ABELLA N., TRUMEL C., "Detection of circulating microfilariae in canine EDTA blood using lens-free technology: preliminary results", *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* **33**, p 572-576 (2021)
DOI: 10.1177/10406387211001092

[A13] MANDULA O., KLEMAN J.P., LACROIX F., ALLIER C., FIOLE D., HERVE L., BLANDIN P., KRAEMER D., MORALES S., "Phase and fluorescence imaging with a surprisingly simple microscope based on chromatic aberration", *Optics Express* **28**, p 2079-2090 (2020)
DOI: 10.1364/OE.28.002079

[A12] ALLIER C., HERVE L., MANDULA O., BLANDIN P., USSON Y., SAVATIER J., MONNERET S., MORALES S., "Quantitative phase imaging of adherent mammalian cells: a comparative study", *Biomedical Optics Express* **10**, p 2768-2783 (2019)
DOI: 10.1364/BOE.10.002768

[A11] DE KERNIER I., ALI-CHERIF A., RONGEAT N., CIONI O., MORALES S., SAVATIER J., MONNERET S., BLANDIN P., "Large field-of-view phase and fluorescence mesoscope with microscopic resolution", *Journal of Biomedical Optics* **24**, 036501 (2019)
DOI: 10.1117/1.JBO.24.3.036501

[A10] HERVE L., CIONI O., BLANDIN P., NAVARRO F., MENNETEAU M., BORDY T., MORALES S., ALLIER C, "Multispectral total-variation reconstruction applied to lens-free microscopy", *Biomedical Optics Express* **9**, Issue 11, p 5828-5836 (2018)
DOI: 10.1364/BOE.9.005828

[A9] PASQUIER C., BLANDIN P., CLADY R., SANNER N., SENTIS M., UTEZA O., LI Y., YAN LONG S., "Handling beam propagation in air for nearly 10-fs laser damage experiments", *Optics Communications* **355**, p 230-238 (2015)
DOI: 10.1016/j.optcom.2015.06.049

[A8] KUBILIUTE R., MAXIMOVA K., LAJEVARDIPOUR A., YONG J., HARTLEY J.S., MOHSIN A.S., BLANDIN P., CHON J.W., SENTIS M., STODDART P.R., KABASHIN A., ROTOMSKIS R., CLAYTON A.H., JUODKAZIS S., "Ultra-pure, water-dispersed Au nanoparticles produced by femtosecond laser ablation and fragmentation", *International Journal of Nanomedicine* **8**, p 2601-2611 (2013)
DOI: 10.2147/IJN.S44163

[A7] BLANDIN P., MAXIMOVA K.A., GONGALSKY M.B., SANCHEZ-ROYO J.F., CHIROVNY V.S., SENTIS M., TIMOSHENKO V.Y., KABASHIN A.V., "Femtosecond laser fragmentation from water-dispersed microcolloids toward fast controllable growth of ultrapure Si-based nanomaterials for biological applications", *Journal of Materials Chemistry B* **1**, p 2489-2495 (2013)
DOI: 10.1039/c3tb20285b

[A6] KABASHIN A.V., SARNET T., GROJO D., DELAPORTE P., CHARMASSON L., BLANDIN P., TORRES R, DERRIEN T.J.Y., SENTIS M., "Laser-ablative nanostructuring of surfaces", *International Journal of Nanotechnology* **9**, issue 3-7, p 230-245 (2012)
DOI: 10.1504/IJNT.2012.045329

[A5] BLANDIN P., LEVEQUE-FORT S., LECART S., COSSEC J., POTIER M., LENKEI Z., DRUON F., GEORGES P., "Time-gated Total Internal Reflection Fluorescence Microscopy with a supercontinuum excitation source", *Applied Optics* **48**, p 553-559 (2009)
DOI: 10.1364/AO.48.000553

[A4] GERHARD C., DRUON F., BLANDIN P., HANNA M., BALEMBOIS F., GEORGES P., FALCOZ F., "Efficient versatile-repetition-rate picosecond source for material processing applications", *Applied Optics* **47**, p 967-974 (2008)
DOI: 10.1364/AO.47.000967

[A3] BLANDIN P., DRUON F., HANNA M., LEVEQUE-FORT S., LESVIGNES C., COUDERC V., LEPROUX P., TONELLO A., GEORGES P., "Picosecond polarized supercontinuum generation controlled by intermodal four-wave mixing for fluorescence lifetime imaging microscopy", *Optics Express* **16**, p 18844-18849 (2008)
DOI: 10.1364/OE.16.018844

[A2] LESVIGNE C., COUDERC V., TONELLO A., LEPROUX P., BARTHELEMY A., LACROIX S., DRUON F., BLANDIN P., HANNA M., GEORGES P., "Visible supercontinuum generation controlled by intermodal four-wave mixing in microstructured fiber", *Optics Letters* **32**, p 2173-2175 (2007)
DOI: 10.1364/OL.32.002173

[A1] BLANDIN P., DRUON F., BALEMBOIS F., GEORGES P., LEVEQUE-FORT S., FONTAINE-AUPART M., "Diode-pumped passively mode-locked Nd:YVO4 laser at 914 nm", *Optics Letters* **31**, p 214-216 (2006)
DOI: 10.1364/OL.31.000214

LISTE DES PUBLICATIONS

Articles publiés dans des proceedings ou des revues sans comité de lecture

[P18] BISSARDON C., MERMET X., MORALES S., BOTTAUSCI F., CARRIERE M., RIVERA F., BLANDIN P., "Light sheet fluorescence microscope for microfluidic chip", *EPJ Web of Conferences* **238**, 04005 (2020)
DOI: 10.1051/epjconf/202023804005

[P17] DE KERNIER I., RONGEAT N., MORALES S., MONNERET S., BLANDIN P., "Design and evaluation of two imaging systems for very wide field fluorescence microscopy", *Proceedings of SPIE* **11075**, 110750A (2019)
DOI: 10.1117/12.2526938

[P16] ISEBE D., GREMION E., DAYNES A., THOUY B., RONGEAT N., BRESSIEUX S., ALI-CHERIF A., REBUFFEL V., JOLY P., MORALES S., CIONI O., BLANDIN P., "High accuracy platelet counting using lensfree imaging", *Proceedings of SPIE* **11075**, 110750O (2019)
DOI: 10.1117/12.2527008

[P15] DE KERNIER I., BRESSIEUX S., RONGEAT N., ALI-CHERIF A., MORALES S., MONNERET S., BLANDIN P., "Statistical study of blood cell populations by very wide-field bimodal phase/fluorescence imaging", *Proceedings of SPIE* **10885**, 108850A (2019)
DOI: 10.1117/12.2506531

[P14] DELACROIX R., MOREL S., HERVE L., BORDY T., BLANDIN P, DINTEN J.M., DRANCOURT M., ALLIER C., "Lens-free microscopy of cerebrospinal fluid for the laboratory diagnosis of meningitis", *Proceedings of SPIE* **10510**, 105100K (2018)
DOI: 10.1117/12.2289539

[P13] LEROY M., DE KERNIER I., BORDY T., MANDULA O., ALLIER C., DINTEN J.M., MONNERET S., BLANDIN P., "Simultaneous multiscale and bimodal imaging using lensfree microscopy", *Proceedings of SPIE* **10413**, UNSP 104130C (2017)
DOI: 10.1117/12.2285951

[P12] MOREL S.N.A., DELON A., BLANDIN P., BORDY T., CIONI O., HERVE L., FROMENTIN C., DINTEN J.M., ALLIER C., "Wide-Field Lensfree Imaging of Tissue Slides", *Proceedings of SPIE* **9536**, 95360K (2015)
DOI: 10.1117/12.2183462

[P11] UTEZA O., BLANDIN P., CLADY R., PASQUIER C., SANNER N., SENTIS M., LI Y., LONG S.Y., "Laser damage test-bench with ultrashort pulses down to 10 fs", *Proceedings of SPIE* **9237**, UNSP 923727 (2014)
DOI: 10.1117/12.2068007

[P10] UTEZA O., BLANDIN P., CHARMASSON L., COUSTILLIER G., GROJO D., KABASHIN A., LEBUGLE M., SANNER N., TCHEREMISKINE V., SENTIS M., LEGARE F., KIEFFER J.C., "ASUR: plateforme d'applications des sources laser ultra-rapides pour l'imagerie X et l'interaction laser-matière", *UVX2012 - 11e Colloque sur les Sources Cohérentes et Incohérentes UV, VUV et X ; Applications et Développements Récents*, 01004 (2013)
DOI: 10.1051/uvx/201301004

[P9] KABASHIN A.V., GROJO D., SARNET T., DELAPORTE P., BLANDIN P., CHARMASSON L., TORRES R., DERRIEN T., SENTIS M., "Nanofabrication with pulsed lasers", *2011 Conference on Lasers and Electro-Optics Europe and 12th European Quantum Electronics Conference (CLEO EUROPE/EQEC)*, pp. 1-1 (2011)
DOI: 10.1109/CLEOE.2011.5943339

[P8] GARDEAZABAL RODRIGUEZ P.F., BLANDIN P., MAKSIMOVIC I., SEPULVEDA E., MURO E., DUBERTRET B., LORIETTE V., "High-resolution fluorescence microscopy using three-dimensional structured illumination", *Proceedings of SPIE* **7367**, 73670X (2009)
DOI: 10.1117/12.831477

[P7] GERHARD C., BLANDIN P. DRUON F., "Stabiler Pikosekundenbetrieb in der Mikromaterialbearbeitung", *Laser + Photonik* **5**, p 66-68 (2008)

[P6] BLANDIN P., LEVEQUE-FORT S., LECART S., DRUON F., GEORGES P., COSSEC J.C., POTIER M.C., LENKEI Z., " FRET detection in the plasma membrane using Total Internal Reflection Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy", *2008 Conference on Lasers and Electro-Optics and 2008 Conference on Quantum Electronics and Laser Science*, pp. 1-2 (2008)
DOI: 10.1109/CLEO.2008.4551061

[P5] GERHARD C., DRUON F., BLANDIN P., HANNA M., BALEMBOIS F., GEORGES P., FALCOZ F., "Efficient versatile-repetition-ate ps source for material processing applications", *2007 European Conference on Lasers and Electro-Optics and the International Quantum Electronics Conference* pp. 1-1 (2007)
DOI: 10.1109/CLEOE-IQEC.2007.4386251

[P4] BLANDIN P., LEVEQUE-FORT S., LECART S., ZELLER P., LENKEI Z., DRUON F., GEORGES P., "Development of a TIRF-FLIM microscope for biomedical applications", *Proceedings of SPIE-OSA* **6630**, 66300B (2007)
DOI: 10.1364/ECBO.2007.6630_10

[P3] BLANDIN P., DRUON F., HANNA M., LEVEQUE-FORT S., LESVIGNES C., COUDERC V., LEPROUX P., GEORGES P., "Supercontinuum generation in a highly birefringent photonic crystal fiber seeded by a low-repetition rate picosecond infrared laser", *Proceedings of SPIE* **6588**, 658808 (2007)
DOI: 10.1117/12.723333

[P2] BLANDIN P., DRUON F., BALEMBOIS F., GEORGES P., LEVEQUE-FORT S., FONTAINE-AUPART M., "Picosecond diode-pumped Nd:YVO4 laser @ 914 nm", *2006 Conference on Lasers and Electro-Optics and 2006 Quantum Electronics and Laser Science Conference*, pP. 1-2 (2006)
DOI: 10.1109/CLEO.2006.4628050

[P1] BLANDIN P., DRUON F., BALEMBOIS F., GEORGES P., LEVEQUE-FORT S., FONTAINE-AUPART M., "Laser Nd:YVO4 impulsionnel à 914 nm pompé par diode", *Journal de Physique IV* **135**, p 249-251 (2006)
DOI: 10.1051/jp4:2006135076

BREVETS PUBLIES

[B10] RACINE B., QUESNEL E., BLANDIN P., « Dispositif d'excitation et de détection de photoluminescence », Publication n°3102848, 07/05/2021, EP, FR, US

[B9] BLANDIN P., ALLIER C., DINTEN J.M., CIONI O., HERVE L., JOLY P., « Procédé de caractérisation d'une particule à partir d'un hologramme », Publication n°3090107, 19/06/2020, EP, FR, US, WO

[B8] RONGEAT N., MONNERET S., DE KERNIER I., BLANDIN P., BORDY T., CIONI O., « Dispositif et procédé d'observation d'un échantillon fluorescent par imagerie défocalisée », Publication n°3081552, 29/11/2019, EP, FR, WO

[B7] BLANDIN P., ALI-CHERIF A., ISEBE D., GREMION E., DAYNES A., « Procédé optique d'estimation d'un volume représentatif de particules présentes dans un échantillon », Publication n°3073047, 03/05/2019, FR, US, WO

[B6] SETIER P.A., FOUILLET Y., BLANDIN P., ALI-CHERIF A., COUDERC G., « Dispositif de protection employé dans un système de détection par imagerie sans lentille et système de détection par imagerie sans lentille employant ledit dispositif », Publication n°3060747, 22/06/2018, EP, FR, WO

[B5] BLANDIN P., ALI-CHERIF A., GREMION E., RAIMBAULT S., DAYNES A., CIONI O., « Procédé de numération de particules dans un échantillon par imagerie sans lentille », Publication n°3060746, 22/06/2018, DE, EP, FR, GB, JP, US, WO

[B4] BORDY T., BLANDIN P., CIONI O., « Procédé de formation d'une image haute résolution par imagerie sans lentille », Publication n°3059113, 25/05/2018, EP, FR, US, WO

[B3] ALLIER C., ALI-CHERIF A., BLANDIN P., ESTEBAN G., HERVE L., ISEBE D., "Procédé de caractérisation d'une particule dans un échantillon", Publication n°3049348, 20/09/2017, CN, EP, FR, IN, JP, KR, US, WO

[B2] BLANDIN P., « Procédé d'observation d'un échantillon par imagerie sans lentille », Publication n°3046238, 30/06/2017, CN, DE, EP, FR, GB, IN, JP, KR, US, WO

[B1] ALI-CHERIF A., ALLIER C., BLANDIN P., « Procédé d'analyse de particules », Publication n°3034196, 30/09/2016, CN, EP, FR, IN, JP, KR, US, WO

COMMUNICATIONS À DES CONGRES
Conférences invitées

[CI4] MAXIMOVA K., ARISTOV A., GROJO D., DELAPORTE Ph., BLANDIN P., KRAVETS V., SENTIS M., GRIGORENKO A.N., KABASHIN A.V., "Engineering plasmonic nano- and metamaterials for ultrasensitive biosensing and imaging", *4th International Conference on Metamaterials, Photonic Crystals and Plasmonics (META'13)*, Charjah, Emirats Arabes Unis, Mars 2013.

[CI3] SENTIS M., BLANDIN P., DELAPORTE Ph., GROJO D., KABASHIN A.V., SARNET Th., SANNER N., UTEZA O., "Pulsed laser processing at nanoscale and applications", *7th International Conference on Surfaces, Coatings and Nanostructured Materials (NANOSMAT)*, Prague, République Tchèque, Septembre 2012

[CI2] UTEZA O., BLANDIN P., CHARMASSON L., COUSTILLIER G., GROJO D., KABASHIN A.V., LEBUGLE M., SANNER N., TCHEREMISKINE V., SENTIS M., LEGARE F., KIEFFER J.C., "ASUR: plateforme d'applications des sources laser ultra-rapides pour l'imagerie X et l'interaction laser-matière", *Colloques sur les Sources Cohérentes et Incohérentes UV, VUV et X: Applications et développements récents (UVX 2012)*, Biarritz, France, Juin 2012

[CI1] KABASHIN A.V., DELAPORTE Ph., GROJO D., PEREIRA A., BLANDIN P., SARNET Th., SENTIS M., "Laser Ablative Nanofabrication", *Second International Workshop on Advanced, Nano- and Biomaterials and Their Applications*, Sibiu, Roumanie, Septembre 2010

COMMUNICATIONS À DES CONGRES
Communications orales avec actes dans un congrès international

[CP22] BISSARDON C., QUINTARD C., MERMET X., MORALES S., BARITAUX J.C., FOUILLET Y., BLANDIN P., "Vascular "Organ-on-chip" imaging: a dedicated single plane illumination fluorescence microscope", *European Conference on Biomedical Optics (ECBO)*, Conférence virtuelle, Juin 2021

[CP21] BISSARDON C., MERMET X., QUINTARD C., FOUILLET Y., MORALES S., BOTTAUSCI F., CARRIERE M., RIVERA F., BLANDIN P., ""Organ-on-chip" specific light sheet fluorescence microscope for vascularization investigation", *Virtual 12th Light Sheet Fluorescence Microscopy Conference 2020*, Virtual conference, Octobre 2020

[CP20] BISSARDON C., MERMET X., MORALES S., BOTTAUSCI F., CARRIERE M., RIVERA F., BLANDIN P., "Light sheet fluorescence microscope for microfluidic chip", *European Optical Society Annual Meeting (EOSAM)*, Online Meeting, Septembre 2020

[CP19] ISÈBE D., GREMION E., DAYNÈS A., THOUY B., RONGEAT N., BRESSIEUX S., ALI-CHERIF A., REBUFFEL V., JOLY P., MORALES S., CIONI O., BLANDIN P., "High accuracy platelet counting using lensfree imaging", *European Conference on Biomedical Optics (ECBO)*, Munich, Allemagne, Juin 2019

[CP18] DE KERNIER I., RONGEAT N., MORALES S., MONNERET S., BLANDIN P., "Design and evaluation of two imaging systems for very wide field fluorescence microscopy", *European Conference on Biomedical Optics (ECBO)*, Munich, Allemagne, Juin 2019

[CP17] ALLIER C., SAVATIER J., MONNERET S., USSON Y., HERVE L., MANDULA O., BLANDIN P., MORALES S., "Quantitative phase imaging of adherent mammalian cells: a comparison of three different techniques", *Photonics West BIOS*, San Francisco, Etats-Unis, Février 2019

[CP16] I. DE KERNIER, N. RONGEAT, A. ALI-CHERIF, S. MORALES, S. MONNERET, P. BLANDIN, "Statistical study of blood cells population by very wide-field phase/fluorescence imaging", *Photonics West BIOS*, San Francisco, Etats-Unis, Février 2019

[CP15] ALLIER C., DELACROIX R., MOREL S., HERVE L., BORDY T., BLANDIN P, DINTEN J.M., DRANCOURT M., "Lens-free microscopy of cerebrospinal fluid for the laboratory diagnosis of meningitis", *Photonics West BIOS*, San Francisco, Etats-Unis, Janvier 2018

[CP14] LEROY M., DE KERNIER I., BORDY T., MANDULA O., ALLIER C., DINTEN J.M., MONNERET S., BLANDIN P., "Simultaneous multiscale and bimodal imaging using lensfree microscopy", *European Conference on Biomedical Optics (ECBO)*, Munich, Allemagne, Juin 2017

[CP13] MOREL S.N.A., DELON A., BLANDIN P., BORDY T., CIONI O., HERVE L., FROMENTIN C., DINTEN J.M., ALLIER C., "Wide-field lensfree imaging of tissue slides", *European Conference on Biomedical Optics (ECBO)*, Munich, Allemagne, Juin 2014

[CP12] UTEZA O., BLANDIN P., CLADY R., PASQUIER C., SANNER N., SENTIS M., LI Y., LONG S.Y., "Laser damage test-bench with ultrashort pulses down to 10 fs", *SPIE Laser Damage - 46th Annual Symposium on Optical Materials for High Power Lasers*, Boulder, Etats-Unis, Septembre 2014

[CP11] MAXIMOVA K., CORREARD F., ESTEVE M.A., BLANDIN P., ROY M., GINGRAS M., SENTIS M., BRAGUER D., KABASHIN A.V., "Synthesis of inorganic nanomaterials by ultrashort laser ablation in liquids", *E-MRS Spring Meeting,* Strasbourg, France, Mai 2013
Prix de la meilleure présentation poster obtenu par K. MAXIMOVA

[CP10] KABASHIN A.V., GROJO D., SARNET T., DELAPORTE P., BLANDIN P., CHARMASSON L., TORRES R., DERRIEN T., SENTIS M., "Nanofabrication with pulsed lasers", *Conference on Laser and Electro-Optic Europe (CLEO Europe)*, Munich, Allemagne, Mai 2011

[CP9] KABASHIN A.V., DELAPORTE Ph., GROJO D., PEREIRA A., BLANDIN P., SARNET Th., SENTIS M., "Laser ablative nanofabrication", *International Conference on Advanced Laser Technologie (ICONO-LAT),* Kazan, Russie, Aout 2010

[CP8] GARDEAZABAL RODRIGUEZ P., BLANDIN P., MAKSIMOVIC I., SEPULVEDA E., MURO E., DUBERTRET B., LORIETTE V., "High-resolution fluorescence microscopy using threedimensional structured illumination", *European Conference on Biomedical Optics (ECBO)*, Munich, Allemagne, Juin 2009

[CP7] DEVAUGES V., BLANDIN P., COSSEC J., LECART S., MARQUER C., POTIER M., DRUON F., GEORGES P., LEVEQUE-FORT S., "FRET detection for neurobiological applications using a Total Internal Reflection Fluorescence Lifetime Imaging Microscope", *European Conference on Biomedical Optics (ECBO)*, Munich, Allemagne, Juin 2009

[CP6] BLANDIN P., LEVEQUE-FORT S., LECART S., DRUON F., GEORGES P., COSSEC J., POTIER M., LENKEI Z., "FRET Detection in the Plasma Membrane Using Total Internal Reflection Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy", *Conference on Laser and Electro-Optic (CLEO)*, San Jose, Etats-Unis, Mai 2008

[CP5] GERHARD C., DRUON F., BLANDIN P., HANNA M., BALEMBOIS F., GEORGES P., "Efficient versatile-repetition-rate ps source for material processing applications", *Conference on Laser and Electro-Optic (CLEO Europe)*, Munich, Allemagne, Juin 2007

[CP4] BLANDIN P., LEVEQUE-FORT S., DRUON F., HANNA M., GEORGES P., BRIANDET R., LENKEI Z., FONTAINE-AUPART M., "Development of a TIRF-FLIM microscope for biomedical applications", *European Conference on Biomedical Optics (ECBO)*, Munich, Allemagne, Juin 2007

[CP3] BLANDIN P., DRUON F., HANNA M., LEVEQUE-FORT S., LESVIGNES C., COUDERC V., LEPROUX P., GEORGES P., "Supercontinuum generation in a highly birefringent photonic crystal fiber seeded by a low-repetition rate picosecond infrared laser", *SPIE Europe Optics and Optoelectronics*, Prague, République Tchèque, Avril 2007

[CP2] BLANDIN P., DRUON F., BALEMBOIS F., GEORGES P., LEVEQUE-FORT S., FONTAINE-AUPART M., "First picosecond Nd:YVO4 diode pumped solid state laser at 914 nm", *Conference on Laser and Electro-Optic (CLEO)*, Long Beach, Etats-Unis, Mai 2006

[CP1] BLANDIN P., DRUON F., BALEMBOIS F., GEORGES P., LEVEQUE-FORT S., FONTAINE-AUPART M., "914 nm diode-pumped passively mode-locked based on Nd :YVO4", *Advanced Solid State Photonics (ASSP)*, Lake Tahoe, Etats-Unis, Février 2006

COMMUNICATIONS À DES CONGRES

Communications orales sans actes dans un congrès international ou national

[CO12] LAVABRE T., POLIZOPOULOU Z.S., ISEBE D., BLANDIN P., CIONI O., REBUFFEL V., BOURGES-ABELLA N., TRUMEL C., "Circulating microfilaria detection in canine EDTA blood using lens-free technology", *European College of Veterinary Clinical Pathology Annual Congress*, Arnhem, Pays-Bas, Septembre 2019

[CO11] I. DE KERNIER, N. RONGEAT, S. MORALES, S. MONNERET, P. BLANDIN, "Wide-field of view quantitative phase imaging", *Focus On Microscopy (FOM)*, Londres, Royaume-Uni, Avril 2019

[CO10] DE KERNIER I., CIONI O., MORALES S., RONGEAT N., ALI-CHERIF A., MONNERET S., BLANDIN P., "Imagerie de phase grand champ de cellules sanguines", *Journées Imagerie Optique Non Conventionnelle*, Paris, France, Mars 2018

[CO9] HERVE L., ALLIER C., BLANDIN P., NAVARRO F., MENNETEAU M., BORDY T., CIONI O., MORALES S., "Multispectral total-variation reconstruction applied to lens-free microscopy", *Biophotonics Congress: Biomedical Optics*, Hollywood, Etats-Unis, Avril 2018

[CO8] ALI-CHERIF A., GREMION E., ISEBE D., DAYNES A., BRESSIEUX S., PAPILLEAU J.L., CIONI O., BORDY T., MORALES S., DINTEN J.M., BLANDIN P., "Towards a disruptive technology in Hematology: lens-free imaging for high precision red blood cell counting and sizing", *International Conference on BioMedical Photonics*, La Grande-Motte, France, Mars 2018

[CO7] DEVAUGES V., MARQUER C., LIOT G., BLANDIN P., COSSEC J., GEORGES P., POTIER M., LEVEQUE-FORT S., "Probing APP and BACE1 proximity by combining time resolved TIRF and FRET detection in living neurons", *Focus On Microscopy (FOM)*, Shanghai, Chine, Mars 2010

[CO6] GARDEAZABAL RODRIGUEZ P., BLANDIN P., MAKSIMOVIC I., SEPULVEDA E., MURO E., FRAGOLA A., DUBERTRET B., LORIETTE V., TAUBERT C., SZEGLIA M.I., OLIVO-MARIN J.C., " Microscope de fluorescence à illumination structurée 3D pour l'imagerie haute-résolution", *Optdiag : Diagnostique et Imagerie Optiques en Médecine*, Paris, France, Mai 2009

[CO5] DEVAUGES V., BLANDIN P., COSSEC J., LECART S., MARQUER C., POTIER M., DRUON F., GEORGES P., LEVEQUE-FORT S., "Total Internal reflection fluorescence lifetime imaging microscopy and FRET detection for neurobiological applications", *Focus On Microscopy (FOM)*, Cracovie, Pologne, Avril 2009

[CO4] DEVAUGES V., BLANDIN P., LEVEQUE-FORT S., LECART S., DRUON F., GEORGES P., COSSEC J., POTIER M., « Développement d'un dispositif de microscopie résolue en temps pour l'étude de processus membranaires », *MifoBio 2008*, Carqueiranne, France, Septembre 2008

[CO3] BALAA K., GOULAM-HOUSSEN Y., DEVAUGES V., BLANDIN P., LEVEQUE-FORT S., FORT E., "Quantitative total internal reflection fluorescence microscopy", *European Optical Society (EOS) Annual Meeting*, Paris, France, Septembre 2008

[CO2] BLANDIN P., LEVEQUE-FORT S., LECART S., DRUON F., GEORGES P., ZELLER P., LENKEI Z., "Développement d'un dispositif de microscopie TIRF résolu en temps pour l'observation de récepteurs membranaires", *Optdiag : Diagnostique et Imagerie Optiques en Médecine*, Paris, France, Mai 2007

[CO1] BLANDIN P., LEVEQUE-FORT S., DRUON F., HANNA M., COUDERC V., GEORGES P., BRIANDET R., LENKEI Z., FONTAINE-AUPART M., "Fluorescence lifetime imaging in TIRF microscopy", *Focus On Microscopy (FOM)*, Valence, Espagne, Avril 2007

COMMUNICATIONS À DES CONGRES

Communications par affiche dans un congrès international ou national

[CA25] C. QUINTARD, C. LAPORTE, G. JONSSON, C. BISSARDON, A. PITAVAL, A. LEOPOLDI, P. BLADIN, J.L. ACHARD, J.M. PENNINGER, F.P. NAVARRO, Y. FOUILLET, X. GIDROL, "Microfluidic device integrating functional endothelial networks and automatic fluid handling with valves", *International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (μTAS)*, Palm Springs, Etats-Unis, Octobre 2021

[CA24] C. BISSARDON, X. MERMET, C. QUINTARD, Y. FOUILLET, S. MORALES, F. BOTTAUSCI, M. CARRIERE, F. RIVERA, P. BLANDIN, "Organ-On-Chip specific light sheet fluorescence microscope for vascularization investigation", *Virtual 12th Light Sheet Fluorescence Microscopy Conference 2020*, Septembre 2020

[CA23] C. BISSARDON, T. KRAMMER, F. BOTTAUSCI, F. SANJUAN, S. MORALES, M. CARRIERE, F. RIVERA, P. BLANDIN, "In-situ visualisation of complex vascularized tissues in microfluidic organ on chip system", *Fluo Day 2019*, Grenoble, France, Novembre 2019

[CA22] ISÈBE D., AMIROUCHE A., PAPILLEAU J.L., PIEDCOQ P., ALESSIO M., VERPLANCK N., BLANDIN P., ALI-CHERIF A., FOUILLET Y., "Reusable microfluidic device for complete blood count applications", *International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (μTAS)*, Bâle, Suisse, Octobre 2019

[CA21] C. ALLIER, J. SAVATIER, S. MONNERET, Y. USSON, O. MANDULA, L. HERVE, P. BLANDIN, S. MORALES, "Quantitative phase imaging of adherent mammalian cells : a comparison of three different techniques", *Quantitative BioImaging Conference (QBI) 2019*, Rennes, France, Janvier 2019

[CA20] I. DE KERNIER, S. MONNERET, P. BLANDIN, "Wide-field, phase and fluorescence imaging – Applications in hematology", *MifoBio 2018*, Seignosse, France, Octobre 2018

[CA19] A. ALI-CHERIF, E. GREMION, D. ISEBE, A. DAYNES, S. BRESSIEUX, J.L. PAPILLEAU, O. CIONI, T. BORDY, S. MORALES, J.M. DINTEN, P. BLANDIN, "Imagerie holographique grand champ pour l'hématologie", *MifoBio 2018*, Seignosse, France, Octobre 2018

[CA18] DE KERNIER I., RONGEAT N., ALI-CHERIF A., MORALES S., MONNERET S., BLANDIN P., "Système d'imagerie phase-fluorescence grand champ", *Horizons de l'Optique*, Toulouse, France, Juillet 2018

[CA17] AZAMOUM Y., TCHEREMISKINE V., BLANDIN P., CLADY R., CHARMASSON L., SANNER N., UTEZA O., SENTIS M., "Development of an Energetic Sub-Picosecond Laser-Plasma X-Ray K-α Source with a High Pulse Repetition Rate", *International Conference on Ultrahigh Laser Intensity (ICUIL)*, Goa, Inde, Octobre 2014

[CA16] AZAMOUM Y., TCHEREMISKINE V., BLANDIN P., CLADY R., CHARMASSON L., SANNER N., UTEZA O., SENTIS M., "Generation and characterization of a sub-picosecond laser-based hard X-ray Kα source with a high pulse repetition rate", *Advanced Laser Technology*, Cassis, France, Octobre 2014

[CA15] UTEZA O., BLANDIN P., CLADY R., SANNER N., SENTIS M., LI Y., LONG S.Y., "Laser damage test-bench with ultrashort pulses down to 10 fs", *SPIE Laser Damage 2014*, Boulder, Etats-Unis, Septembre 2014

[CA14] AZAMOUM Y., TCHEREMISKINE V., BLANDIN P., CLADY R., CHARMASSON L., SANNER N., UTEZA O., SENTIS M., "Génération d'une source de rayons X, Kα intense sub-picoseconde par plasma laser à fort taux de repetition", *Congrés Société Française de Physique – Division Plasmas*, Toulouse, France, Mai 2014

[CA13] MAXIMOVA K., BLANDIN P., SENTIS M., KABASHIN A.V., "Femtosecond laser fragmentation for synthesis of ultrapure nanomaterials for biological applications", *International Conference on Laser Ablation*, Ischia, Italie, Octobre 2013.

[CA12] MAXIMOVA K., BLANDIN P., KABASHIN A., « Synthesis of novel nanomaterials by ultrashort laser ablation in liquids », *MifoBio 2012*, Talmont Saint Hilaire, France, Octobre 2012

[CA11] BLANDIN P., CHARMASSON L., COUSTILLIER G., GROJO D., KABASHIN A., LEBUGLE M., SANNER N., TCHEREMISKINE V., UTEZA O., SENTIS M., LEGARE F., KIEFFER J.C., "ASUR: Ultra-fast Laser Source Application Infrastructure", *Light at Extreme Intensities*, Szeged, Hongrie, Novembre 2011.

[CA10] UTEZA O., BLANDIN P., CHARMASSON L., COUSTILLIER G., GROJO D., KABASHIN A., LEBUGLE M., SANNER N., TCHEREMISKINE V., SENTIS M., LEGARE F., KIEFFER J.C., "ASUR: plateforme d'applications des sources lasers ultra-rapides", *9ème Journée des Phénomènes Ultra-rapides*, Rouen, France, Octobre 2011.

[CA9] BLANDIN P., CHARMASSON L., COUSTILLIER G., GROJO D., KABASHIN A., LEBUGLE M., SANNER N., TCHEREMISKINE V., UTEZA O., SENTIS M., "ASUR: plateforme d'applications des sources lasers ultra-rapides", *Horizons de l'Optique*, Marseille, France, Juin 2011

[CA8] KABASHIN A.V., DELAPORTE Ph., GROJO D., PEREIRA A., BLANDIN P., SARNET Th., SENTIS M., "Nanofabrication with Pulsed Lasers", *International Conference on Nanophotonics*, Tsukuba, Japon, Juin 2010

[CA7] DEVAUGES V., BLANDIN P., LEVEQUE-FORT S., LECART S., DRUON F., GEORGES P., COSSEC J., POTIER M., "FRET detection using Total Internal Reflection Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy and supercontinuum excitation", *Symposium "Optical Microscopy in Good Shape"*, Paris, France, Mai 2008

[CA6] COSSEC J., SIMON A., BLANDIN P., LECART S., MOLDRICH R., LETERRIER C., ROSSIER J., LEVEQUE-FORT S., LENKEI Z., POTIER M., "Effects of cholesterol on APP trafficking in HEK cells", *Molecular Mechanisms of Neurodegeneration*, Antigua et Barbuda, Décembre 2007

[CA5] BLANDIN P., DRUON F., HANNA M., LEVEQUE-FORT S., LESVIGNES C., COUDERC V., LEPROUX P., GEORGES P., "Supercontinuum generation in a highly birefringent photonic crystal fiber seeded by a low-repetition rate picosecond infrared laser", *International Quantum Electronics Conference (IQEC)*, Munich, Allemagne, Juin 2007

[CA4] BLANDIN P., LEVEQUE-FORT S., DRUON F., FONTAINE-AUPART M., GEORGES P., « Développement instrumental pour la microscopie de fluorescence résolue en temps », *Colloque Bouyssy jeunes chercheurs de l'Université Paris Sud 11*, Orsay, France, Février 2007

[CA3] BLANDIN P., LEVEQUE-FORT S., BRIANDET R., FONTAINE-AUPART M., GEORGES P., "Développement d'un dispositif de microscopie TIRF pour l'imagerie de durée de vie de fluorescence", *Journée SFO Photonique et Science du Vivant*, Paris, France Novembre 2006

[CA2] BLANDIN P., LEVEQUE-FORT S., FONTAINE-AUPART M., GEORGES P., BRIANDET R., "Total Internal Reflection Fluorescence for fluorescence lifetime imaging", *European Optical Society (EOS) Annual Meeting*, Paris, France, Octobre 2006

[CA1] BLANDIN P., DRUON F., BALEMBOIS F., GEORGES P., LEVEQUE-FORT S., FONTAINE-AUPART M., "Impulsions picosecondes à 914 nm à partir d'un laser Nd:YVO4 pompé par diode", *Journées Nationales des Cristaux pour l'Optique (JNCO)*, Valpré-Ecully, France, Décembre 2005