

Microscopie à fluorescence

De l'épifluorescence à la super-résolution

Elisabeth WERKMEISTER

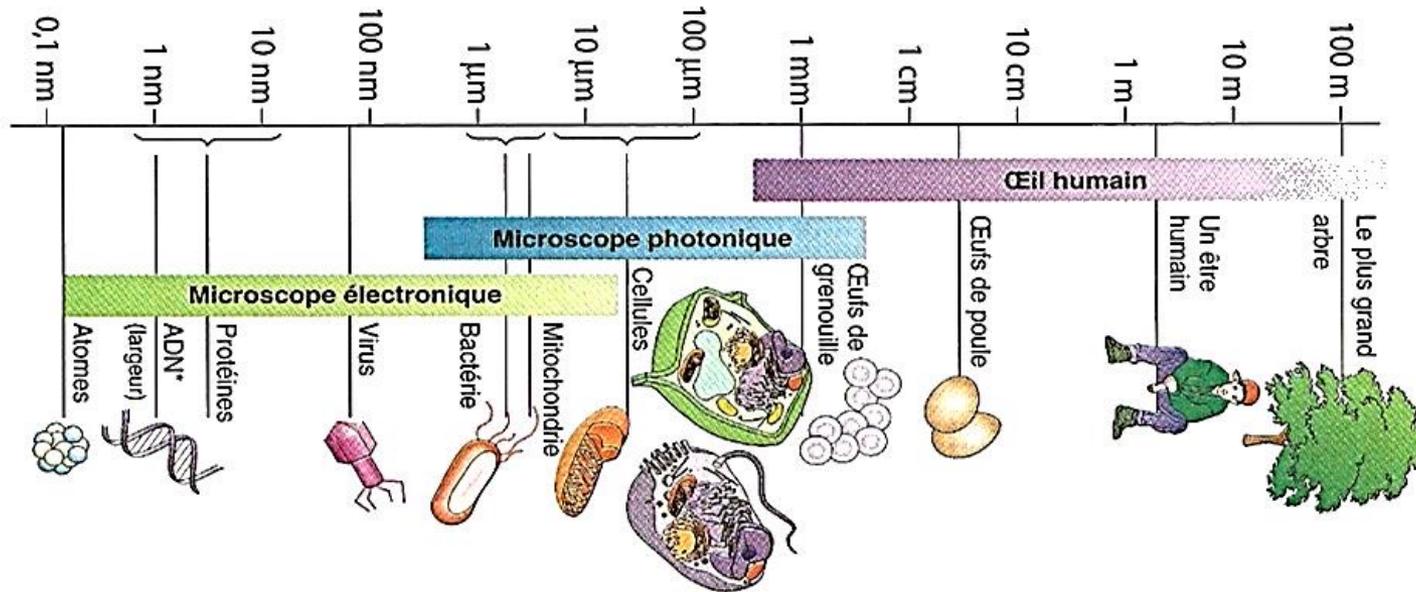
Institut Pasteur de Lille
CNRS – Inserm – Univ Lille
Cellular Microbiology and Physics of Infection

<http://www.cmip.cnrs.fr>

elisabeth.werkmeister@ibl.cnrs.fr

16/11/2020

A quoi sert un microscope?



Le microscope est un instrument qui donne une image grossie d'un petit objet (grossissement), sépare les détails de celui-ci sur l'image (résolution), et rend les détails visibles à l'œil, ou avec une caméra

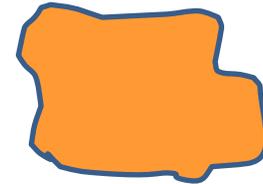
A quoi sert un microscope?

Object



Objectif

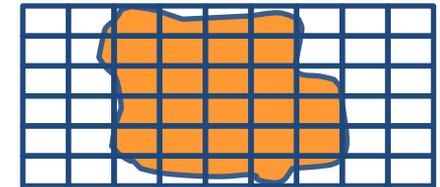
Physical Image



Détection



Real Image



Numérisation

Numerical Image



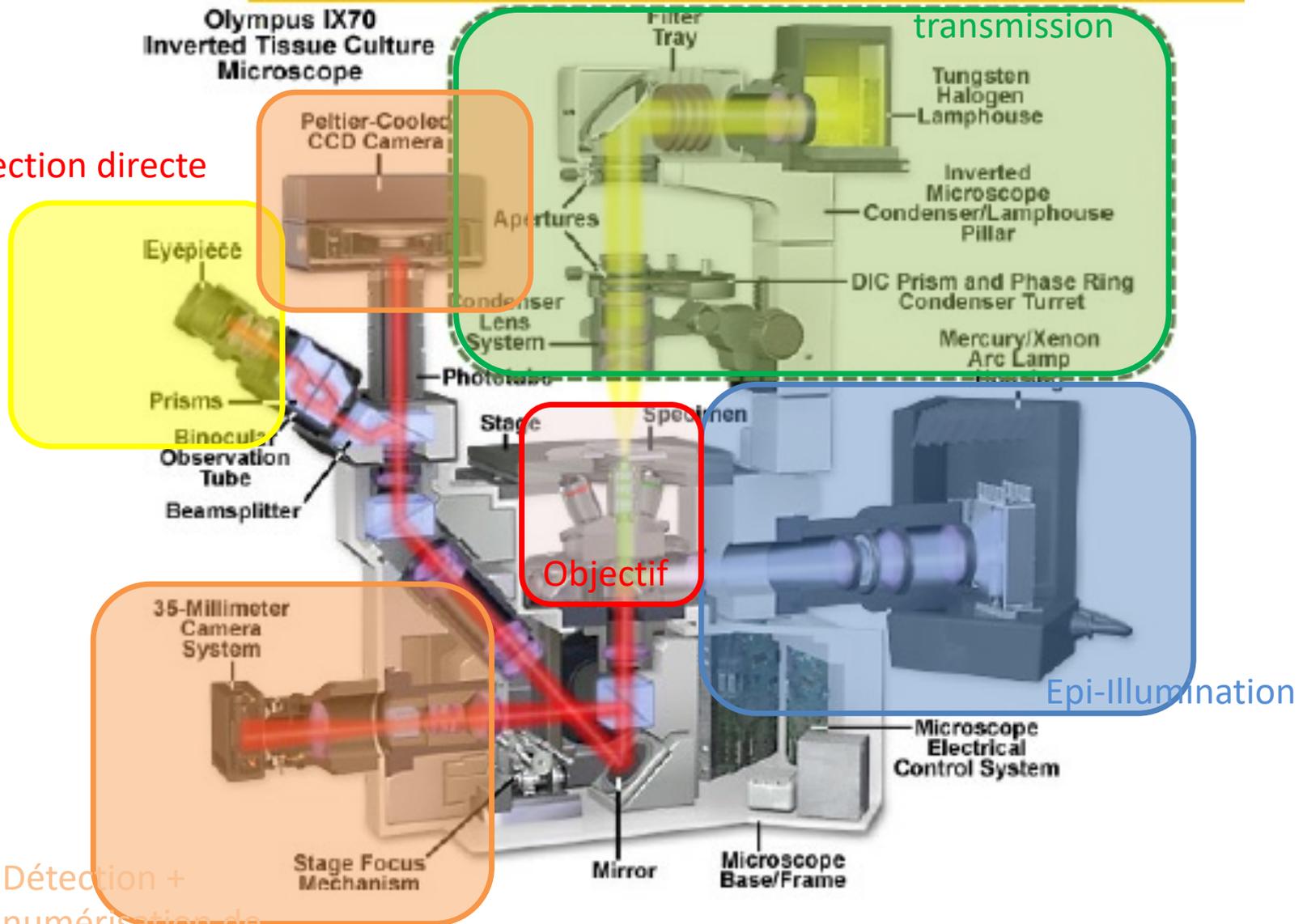
```
01000111011  
10001111011  
00011010010
```

...

Les différents constituants d'un microscope

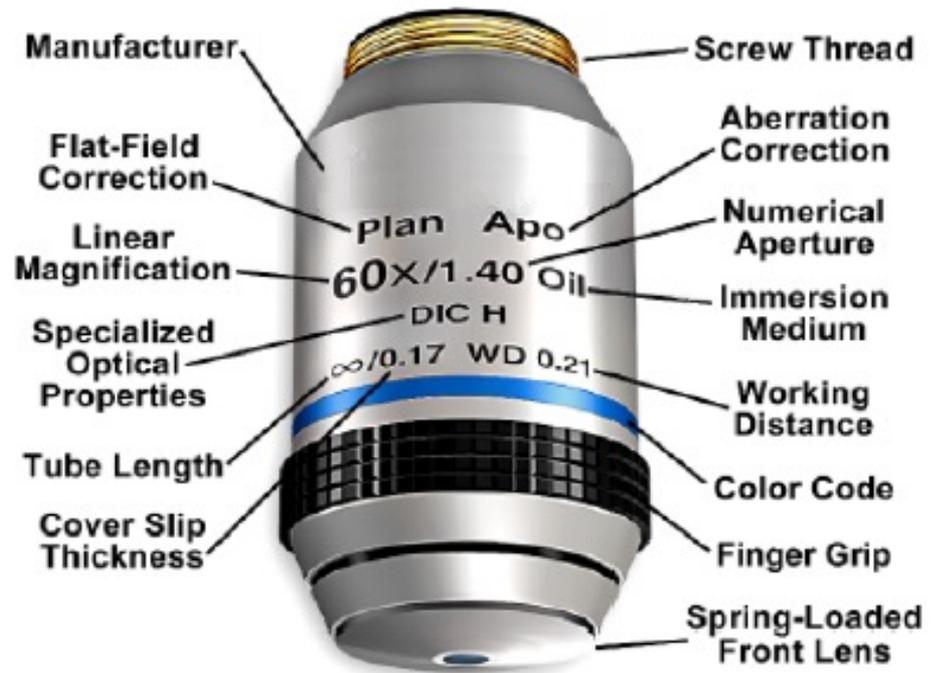
Illumination en transmission

Détection directe



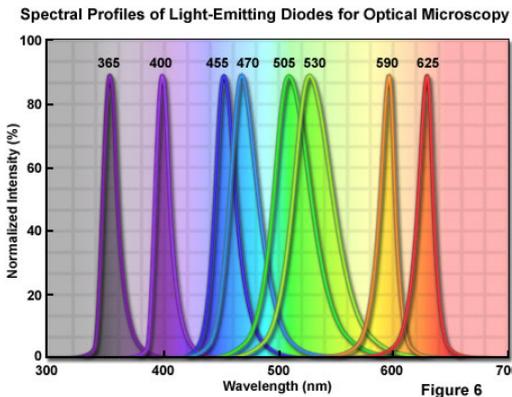
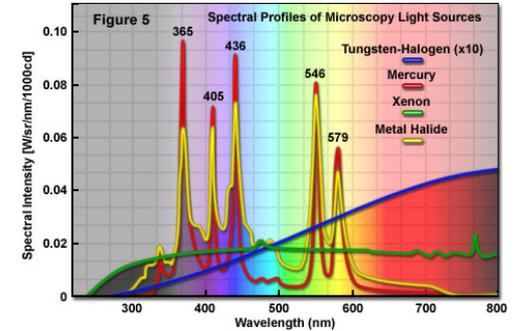
Les caractéristiques d'un objectif

- ouverture numérique (ex. : 1,4)
- grandissement (ex.: 60x)
- milieu d'immersion (air, eau, huile)
- type de correction
- distance de travail



Les sources d'illumination pour la microscopie de fluorescence

Les différents types de lampes présentent en général des spectres larges. Il sera nécessaire d'utiliser des filtres optiques pour sélectionner spécifiquement les longueurs d'onde d'excitation. Les lampes nécessitent un changement d'ampoule assez fréquent et des manipulations de recentrage.



Les LEDs présentent l'avantage d'être très stables, et d'avoir des durées de vie très longues. La commutation entre deux longueurs d'ondes pourra se faire très rapidement. La gamme spectrale 530 – 590 nm est peu fournie. Or il s'agit de longueur d'onde souvent utiles en microscopie d'échantillons biologiques. Leur puissance est parfois trop faible pour certaines applications.

Le principal inconvénient des lasers est leur coût, surtout lors d'application multi longueurs d'onde. Comme pour les LEDs, un ajustement fin de la puissance, et la possibilité de travailler en mode impulsif permet de trouver le meilleur compromis pour éviter la photo toxicité et le blanchiment de l'échantillon.

Les sources d'illumination pour la microscopie de fluorescence

Tableau 2

Comparaison des différentes technologies d'illumination en imagerie de fluorescence.

| Technologies | Spectre utile | Puissance | Uniformité | Réponse temporelle | Émission de chaleur | Temps de vie | Prix |
|-------------------------|---------------|-----------|------------|--------------------|---------------------|--------------|--------|
| Tungstène | Élevé | Faible | Faible | Faible | Moyenne | Faible | Faible |
| Lampe à arc | Élevé | Moyenne | Faible | Faible | Élevée | Faible | Moyen |
| Laser DPSS | Moyen | Élevée | Élevée | Faible | Faible | Moyen | Élevé |
| Diode laser | Moyen | Moyenne | Élevée | Élevée | Faible | Moyen | Élevé |
| Laser blanc | Élevé | Élevée | Élevée | Élevée | Faible | Moyen | Élevé |
| LED | Élevé | Moyenne | Moyenne | Élevée | Faible | Élevé | Faible |
| Tube luminescent | Élevé | Élevée | Élevée | Élevée | Faible | Élevé | Moyen |

Les différents types de détecteurs

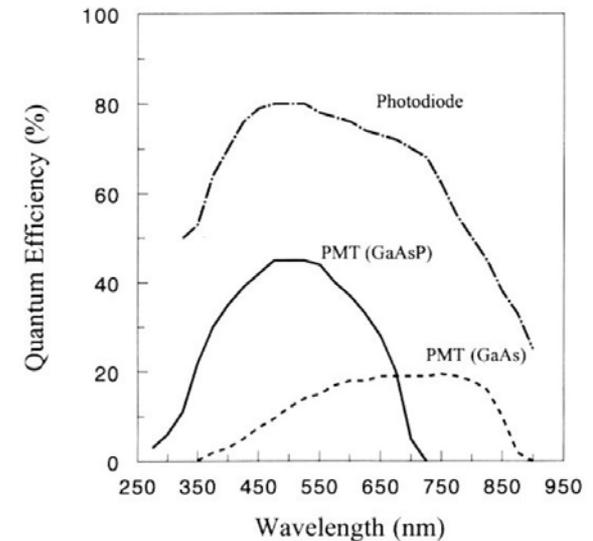
Mono point

PMT Photomultiplicateur

APD Photodiode à avalanche

GaAsP

Détecteur Hybride



Ces détecteurs peuvent être utilisés avec les méthodes de microscopie utilisant un balayage (reconstruction de l'image point par point). En fonction de la technologie utilisée, le détecteur sera plus ou moins efficace en fonction de la gamme spectrale utilisée

Les différents types de détecteurs

Matriciel - Caméra

Différents types de caméras sont sur le marché de la microcopie actuellement. Il existe des caméras de type CCD, sCMOS, EMCCD.

Chaque type de caméra présente ses avantages et inconvénients (sensibilité, vitesse de transfert, rapport Signal/Bruit), taille de pixel.

Les différents types de détecteurs – les caméras

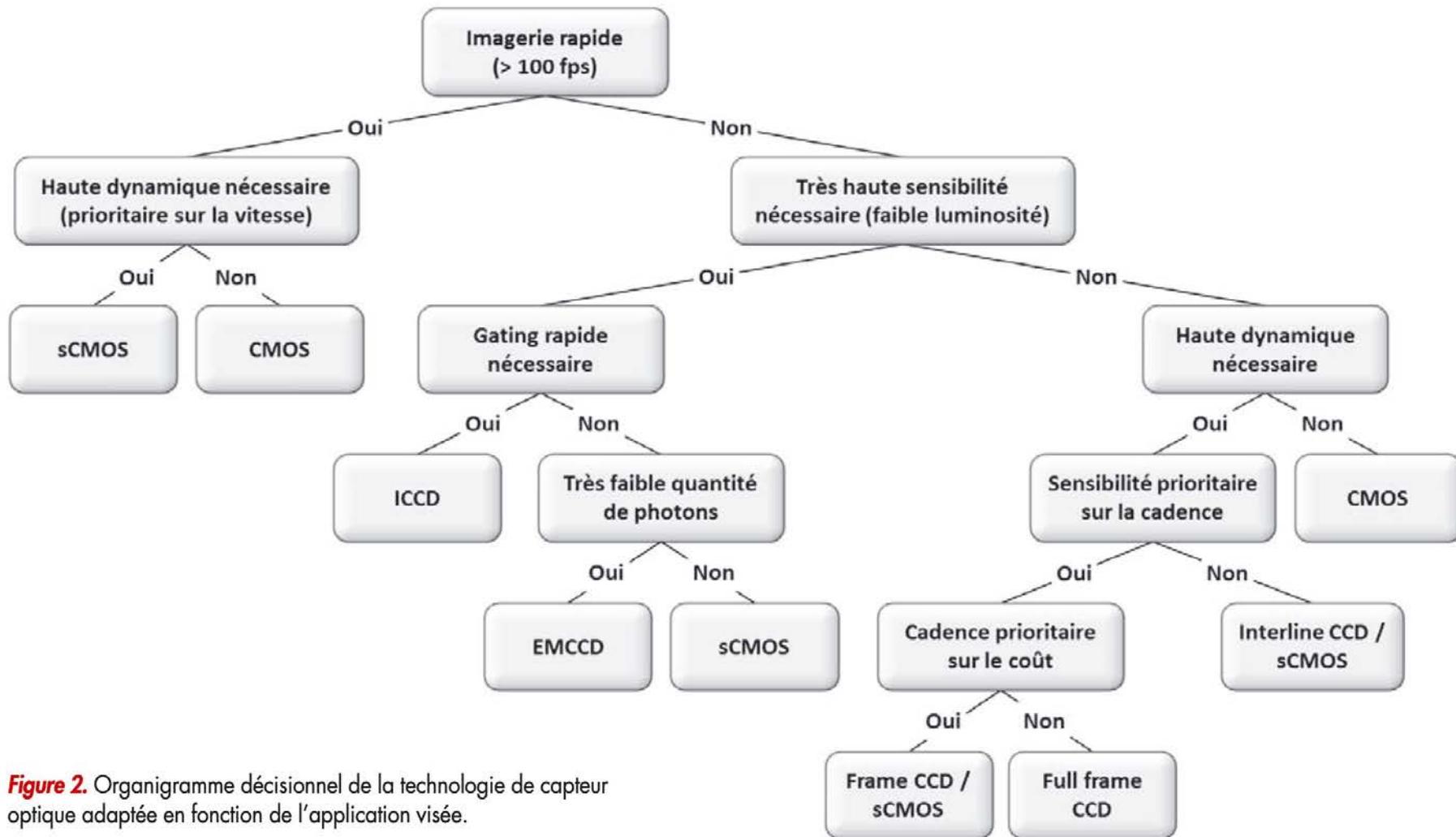
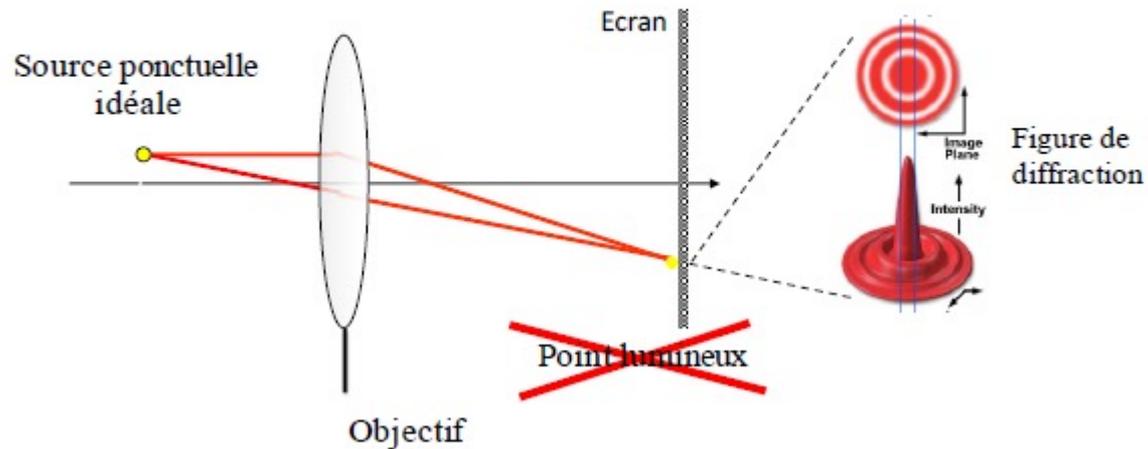
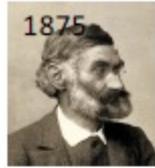


Figure 2. Organigramme décisionnel de la technologie de capteur optique adaptée en fonction de l'application visée.

La limite de diffraction

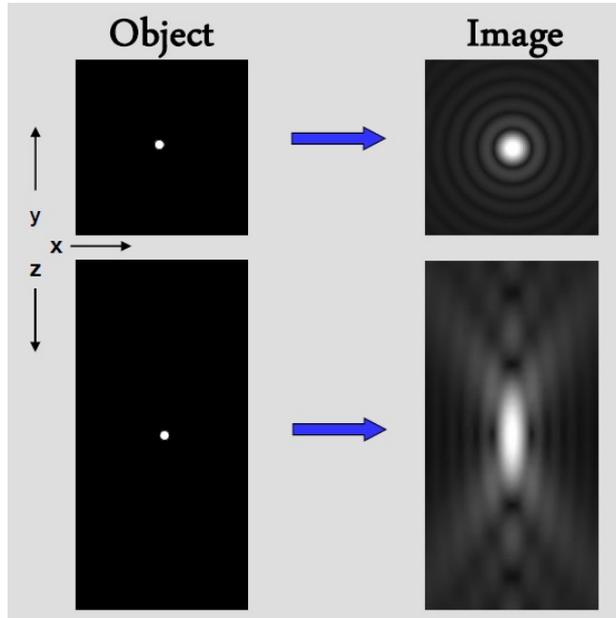


L'image d'une source ponctuelle n'est pas un point, mais une tâche de diffraction, souvent appelée PSF (Point Spread Function). Cette limite de diffraction va conditionner la résolution qu'on pourra obtenir avec un microscope.

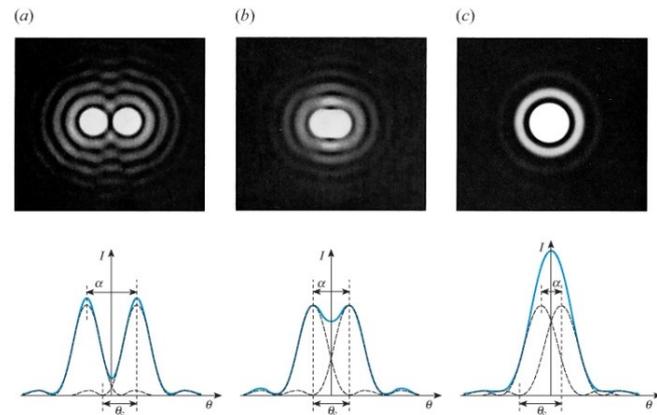
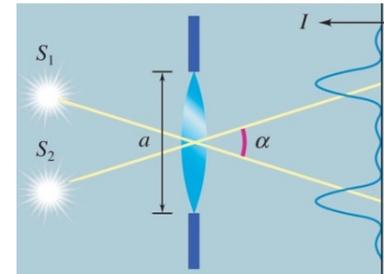
La résolution

$$f(t) \longrightarrow \boxed{h(t)} \longrightarrow g(t)$$

$$g(t) = f(t) \otimes h(t) = \int f(t) \cdot h(\zeta - t) \cdot d\zeta$$

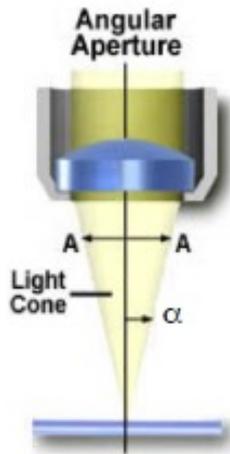


Le pouvoir de résolution d'un microscope correspond à la capacité de distinguer deux sources ponctuelles très proches



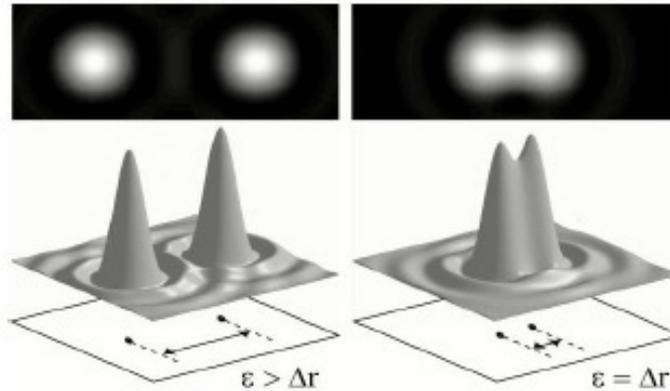
Le paramètre quantitatif utilisé est le critère de Rayleigh : On arrive à la limite de résolution lorsque le maximum de la première gaussienne correspond au minimum de la seconde

La résolution



Numerical Aperture (NA) = $n (\sin \alpha)$

n : indice de réfraction
 α : demi-angle du cône
d'illumination



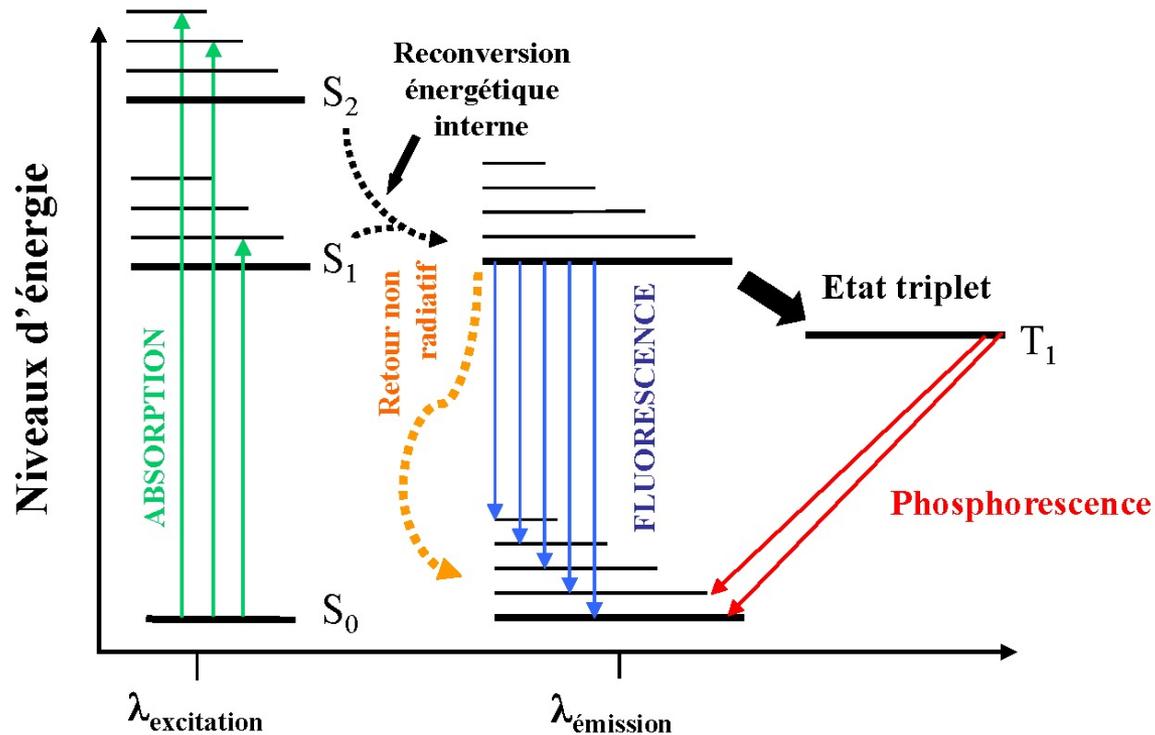
$$d_{xy} = \frac{0.61 \lambda}{\text{N.A.}} \quad d_z = \frac{4 \lambda}{(\text{N.A.})^2}$$

27

Le pouvoir de résolution d'un microscope dépend de la longueur d'onde utilisée, ainsi que de l'ouverture numérique de l'objectif.

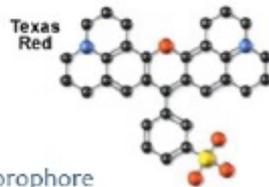
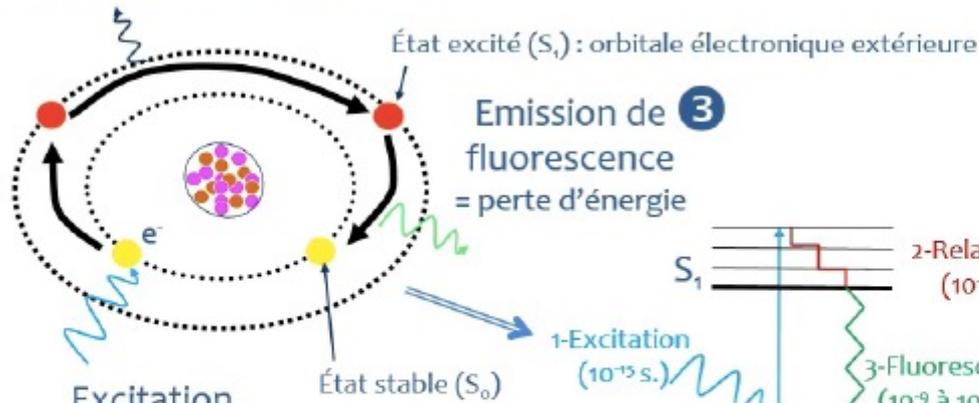
En biologie, on travaille avec de la lumière visible (450 – 700 nm) et des objectifs avec des ouvertures numériques jusqu'à 1,4 → La résolution ainsi obtenue est de l'ordre de 250 nm.

Le principe de la fluorescence – Diagramme de Jablonski



L'absorption d'un photon d'une longueur d'onde définie peut amener une molécule à un état excité. Dans le cas de la fluorescence, le retour à l'état fondamental de la molécule s'accompagne de l'émission d'un photon de longueur supérieure.

2
Perte d'énergie (potentielle, thermique, cinétique...): **relaxation**



Molécule fluorescente = Fluorophore

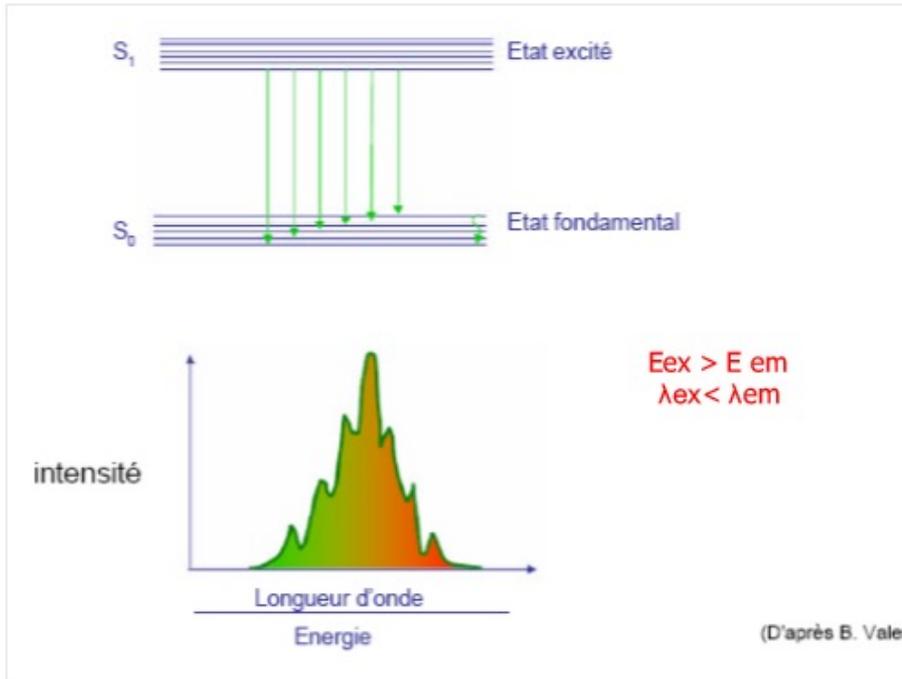
Diagramme énergétique (très simplifié) de Jablonski

= le photon libéré est moins énergétique que le photon incident

Spectres d'excitation et d'émission d'un fluorophore

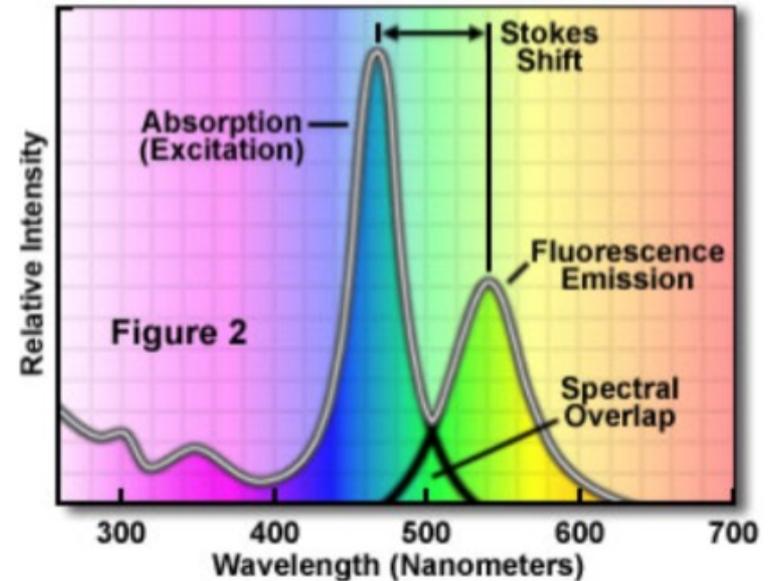
Longueur d'onde d'émission : λ_{em}

(valeur donnée au maximum d'intensité du spectre)



En raison de la dissipation d'énergie, l'énergie émise est plus faible que l'énergie excitatrice. La longueur d'onde d'émission est plus élevée que la longueur d'onde d'excitation.

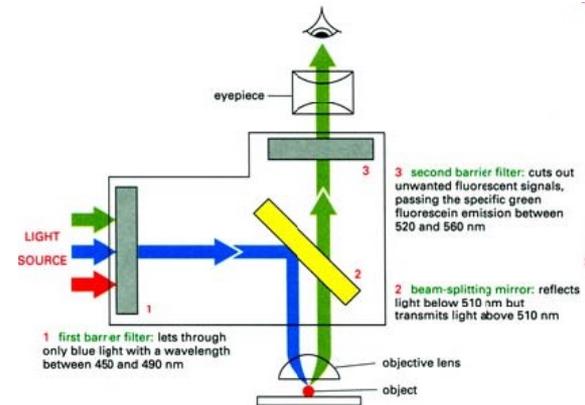
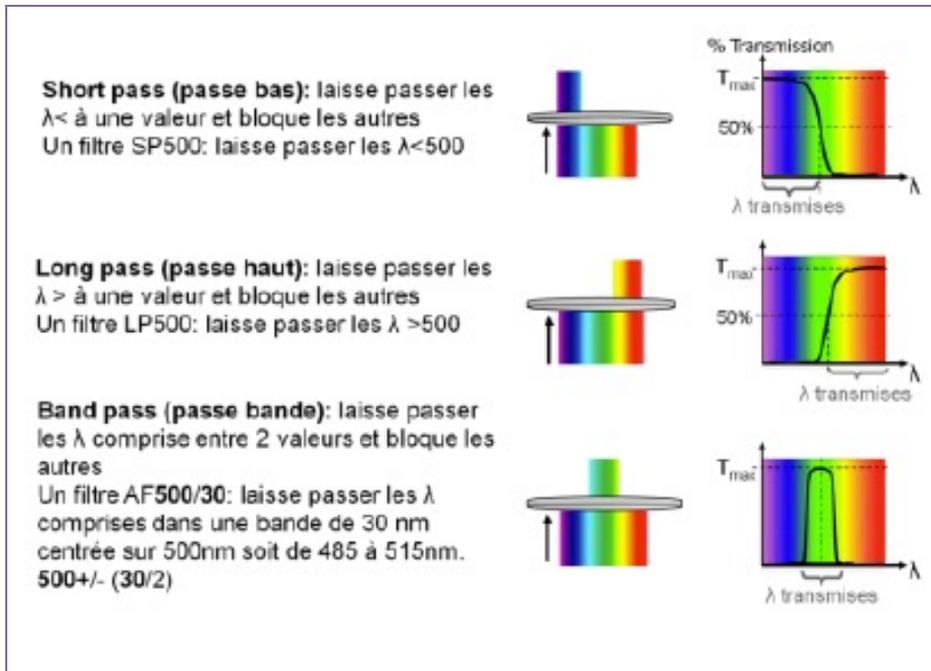
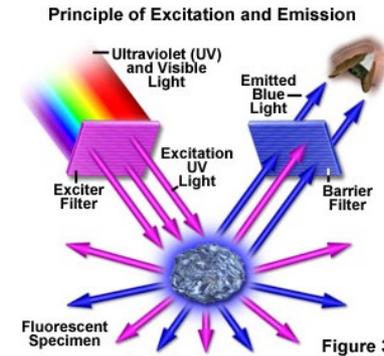
Excitation and Emission Spectral Profiles



En pratique, pour pouvoir séparer efficacement, à l'aide de miroirs dichroïques, la forte lumière incidente (λ_1) de la faible fluorescence émise (λ_2), ce déplacement doit être **>20 nm**. Éventuellement, un déplacement de Stokes important (vis. chlorophylle, iodure de propidium, Red670, Tricolor) facilitera la réalisation de marquages multiples en conjonction avec des fluorochromes ayant des déplacements de Stokes plus faibles (FITC, RITC, Texas Red).

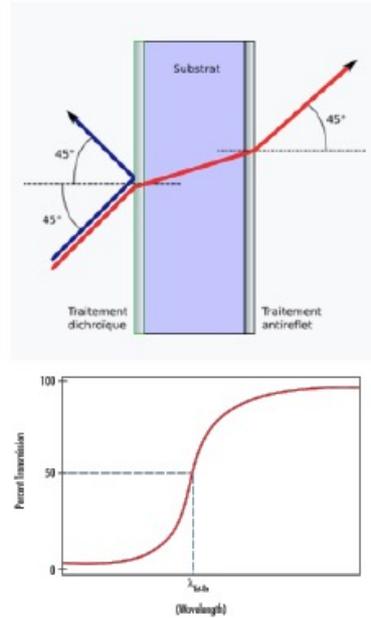
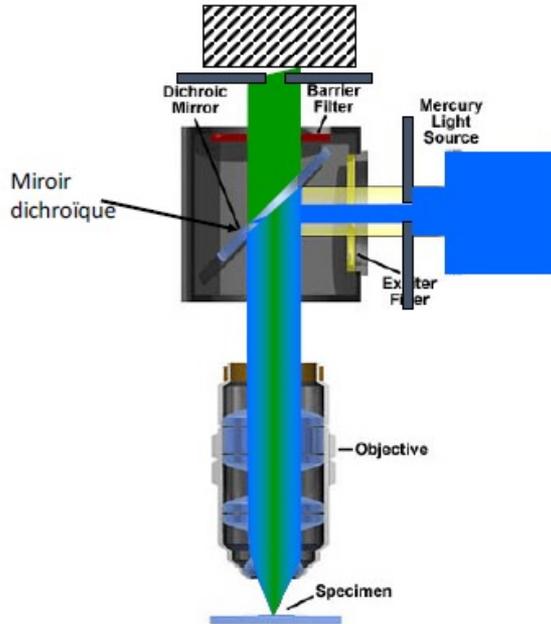
Filtres et dichroïques

En général, on utilise deux filtres pour faire une observation en microscopie de fluorescence : le premier permettant de sélectionner les longueurs d'onde d'excitation, le second pour filtrer le signal de fluorescence émis par l'échantillon arrivant au niveau du détecteur.



En pratique, on utilise souvent des cubes composés de ces deux filtres, ainsi que d'un miroir dichroïque permettant de renvoyer la lumière soit vers l'échantillon, soit vers le détecteur.

Filtres et dichroïques



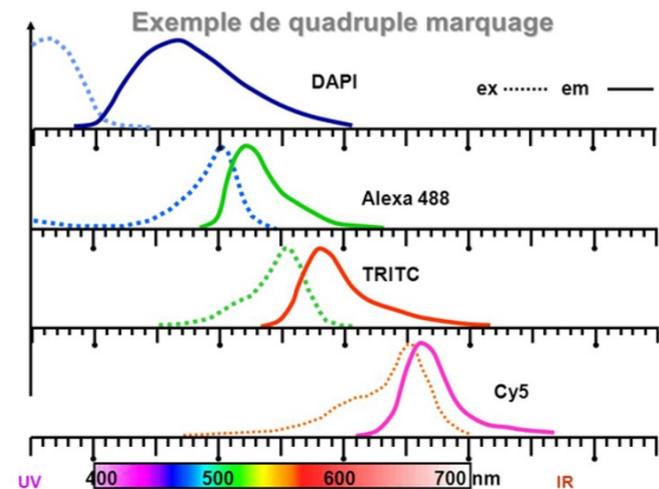
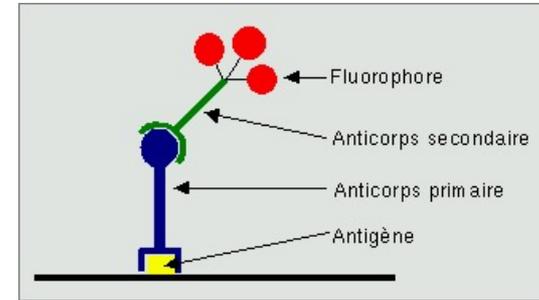
Un miroir dichroïque est réfléchissant pour une certaine gamme de longueur d'ondes et traversant pour les autres.

Dans le cas illustré à gauche, la lumière « bleue » provenant de la source d'excitation est réfléchi sur le miroir et arrive sur l'échantillon. En réponse à cette excitation, l'échantillon va émettre une fluorescence verte. Celle-ci traversera le miroir dichroïque pour arriver jusqu'au détecteur

Multi marquage d'un échantillon

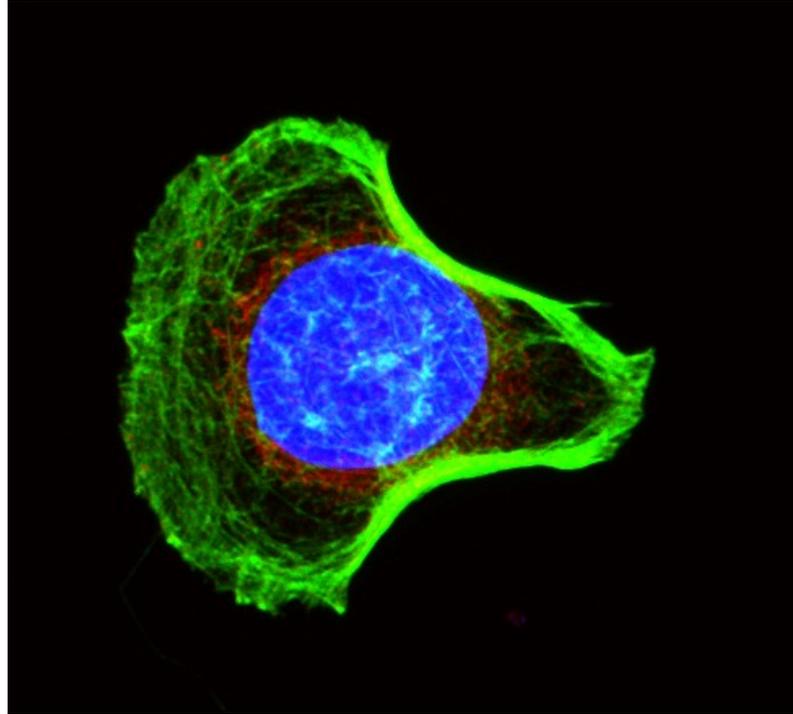
Lorsque l'on veut observer des éléments d'intérêt au niveau d'un échantillon, on procède à un « marquage » des éléments par des molécules appelées fluorophores. En réalité on mesurera le signal provenant de ces fluorophores.

On peut utiliser simultanément plusieurs fluorophores sur le même échantillon et ainsi imager plusieurs structures au sein du même échantillon

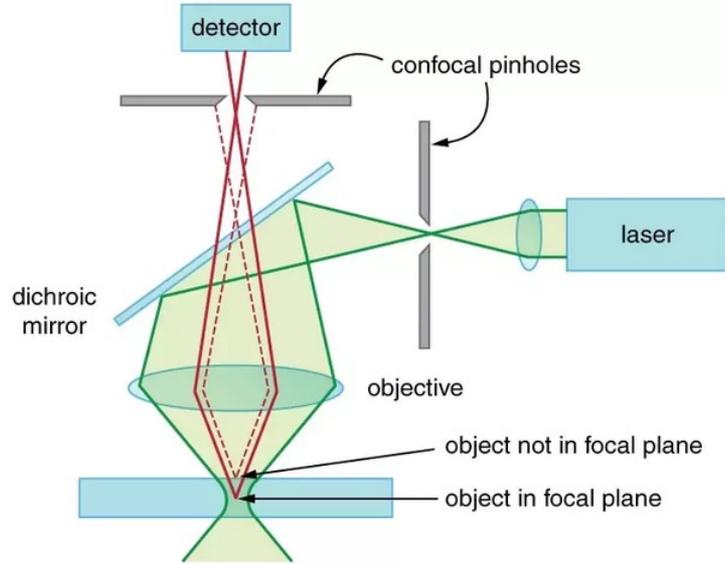


Attention à bien choisir les combinaisons de fluorophores et les filtres adéquats pour minimiser les problèmes d'overlap (passage du signal d'un fluorophore dans un autre canal)

Exemple d'échantillon multi marqué

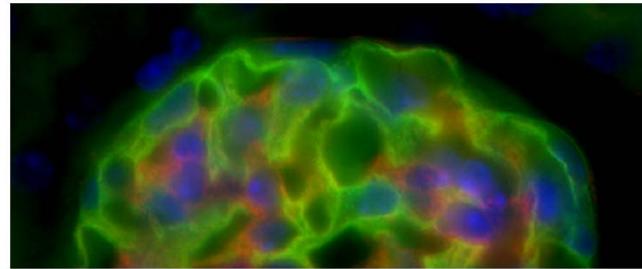


La microscopie confocale, premier pas vers un gain de résolution

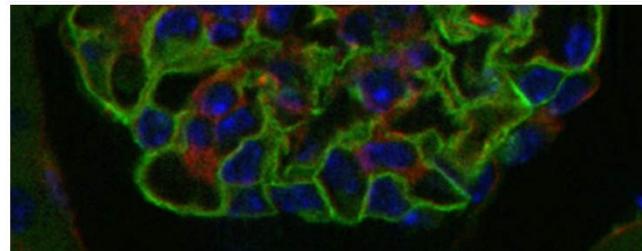


En microscopie confocale, on vient insérer un diaphragme (pinhole) dans le trajet optique. Le but de ce diaphragme est de ne laisser arriver au détecteur que le signal émanant du plan focal. Le signal provenant des plans adjacents au plan focal sont boqués, ne parviennent pas au détecteur, et ne viennent donc pas « flouter » notre image.

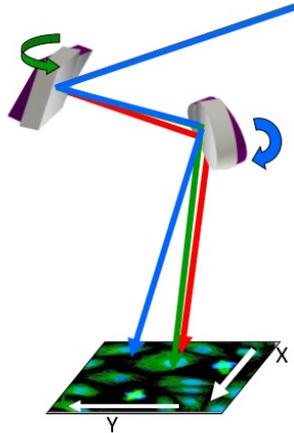
Wide field



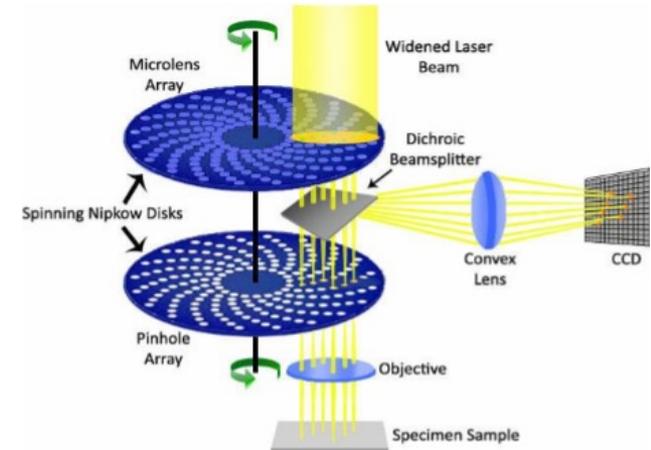
Confocal



Confocal Laser Scanning Microscopy CLSM versus Spinning Disk (Disque de Nipkow)



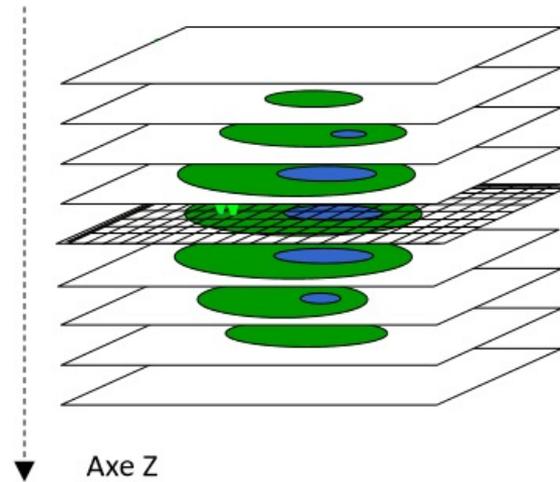
Le faisceau laser est renvoyé sur l'échantillon grâce à des miroirs galvanométriques. La position de ces miroirs permet un balayage du faisceau laser sur l'échantillon. Un détecteur monopoint (PMT, GasP, Detecteur Hybride,...) permet d'enregistrer le signal pixel par pixel de l'image.



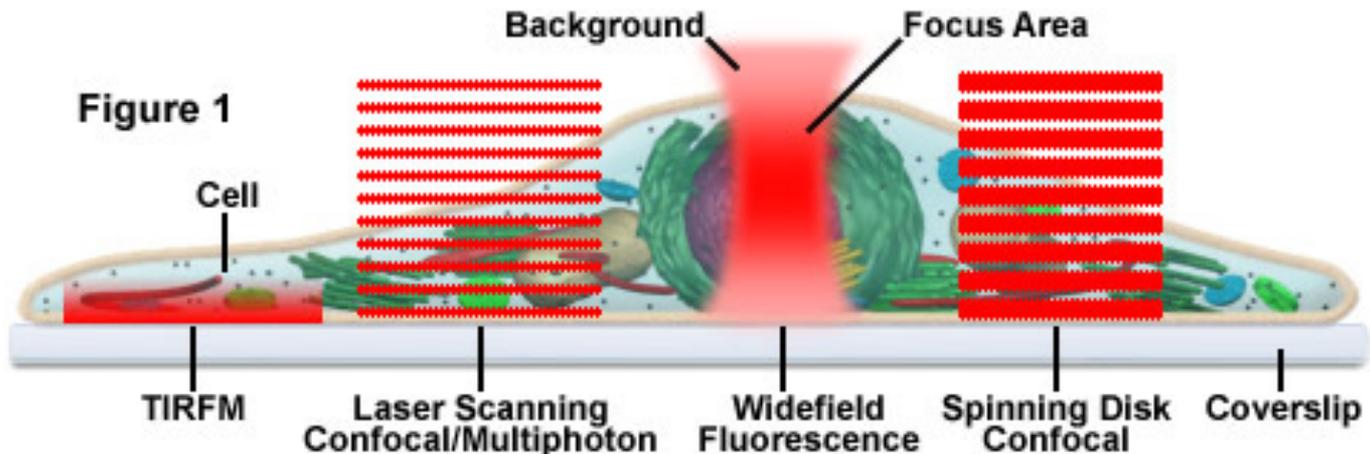
Cette technologie est basée sur une illumination plein champ. Le signal émis par l'échantillon traverse une roue de pinhole qui tourne à vitesse très rapide pour créer l'effet confocal. Le signal est détecté sur un capteur matriciel (caméra CCD, EMCCD, sCMOS,...).

Confocal – Acquisition en 3D

Pour ces deux types de microscopie confocale, une acquisition en 3D de l'échantillon est possible. Il suffit de déplacer le plan focal au travers de l'échantillon et d'enregistrer les images plan par plan. La résolution en z sera meilleure en CLSM.



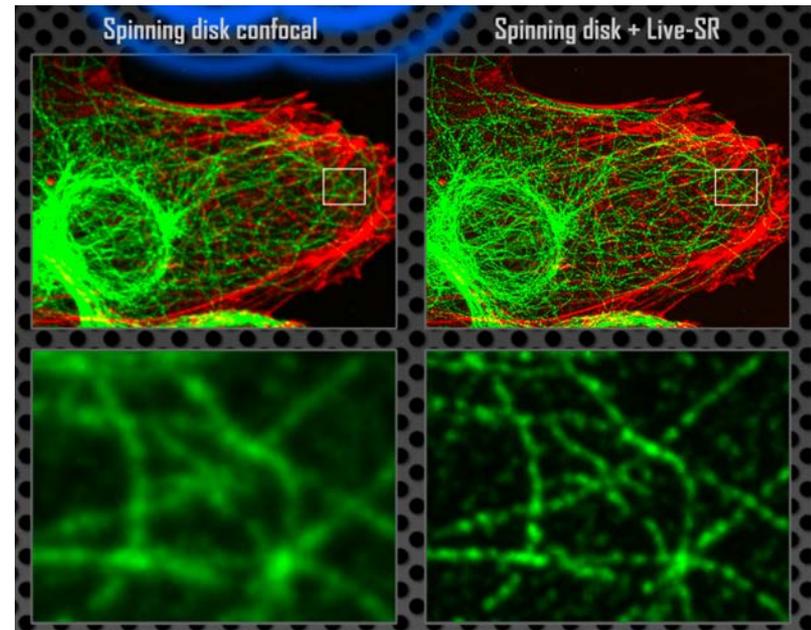
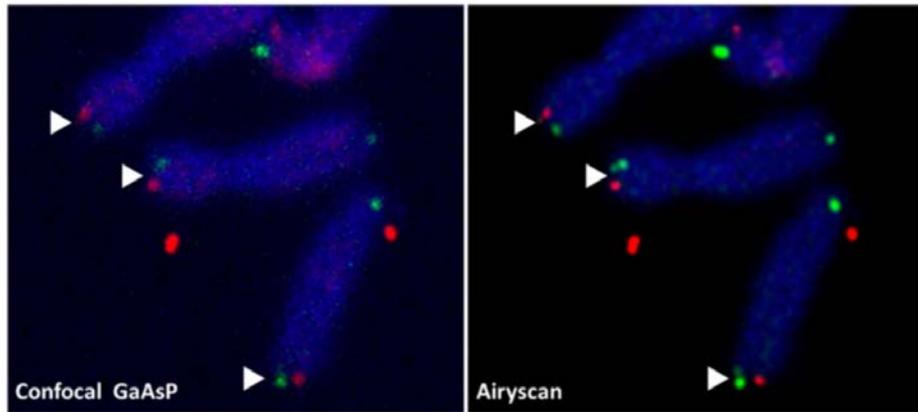
Fluorescence Imaging Modes in Live-Cell Microscopy



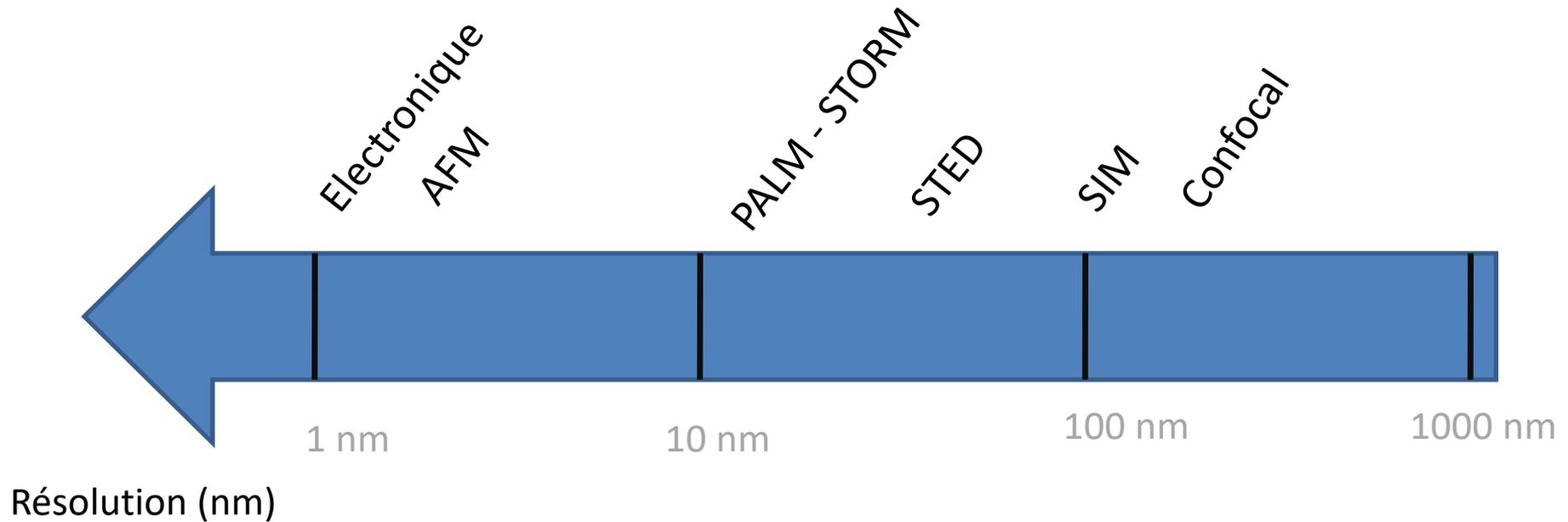
Vers l'amélioration des techniques confocales

De nouvelles techniques ont été développées ces dernières années pour améliorer la résolution confocale. Ces outils permettent de travailler avec les fluorochromes utilisés classiquement en microscopie confocale (ce qui n'est pas toujours le cas en microscopie super resolution) et permettent un gain en résolution d'un facteur 1.7 (environ 140 – 150 nm).

Figure 3: Telomere replication without RTEL1.



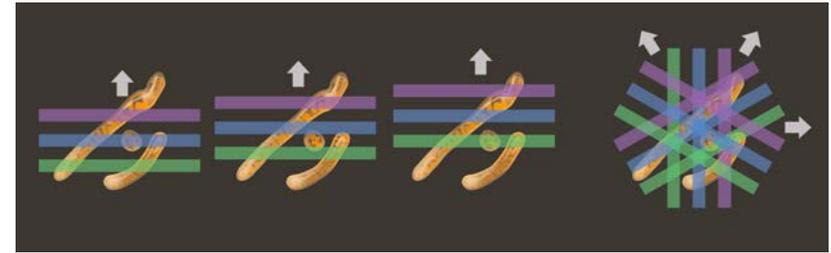
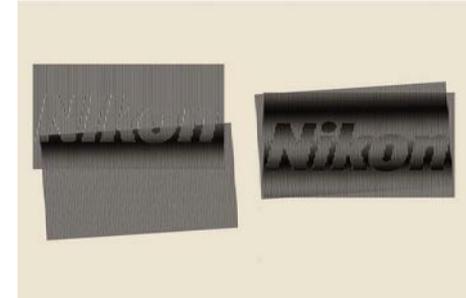
Les techniques de « super-resolution »



Pour observer de très petites structures au niveau des échantillons biologiques, la microscopie confocale n'est pas toujours suffisamment résolue. De nouvelles technologies ont vu le jour cette dernière décennie. Elles ne permettent pas d'atteindre les résolutions de la microscopie électronique et de l'AFM. Par contre, elles sont basées sur l'imagerie de fluorescence et tous ses avantages (spécificité de marquage, observation d'échantillons vivants,...)

SIM - Structured Illumination Microscopy – Principe

- Eclairage de l'échantillon au travers d'un élément structurant (grille) de fréquence spatiale connue → Obtention de franges de Moiré
- Traitement analytique des motifs de Moiré → restauration mathématiques de structures de sous-résolution de l'échantillon
- Gain x2 en résolution



des objectifs d'environ le double de la NA (Fig. C).

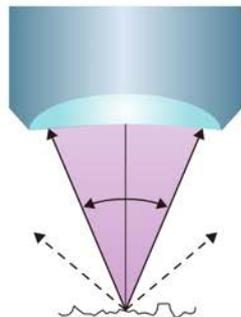


Fig. A : La résolution est limitée par la NA de l'objectif

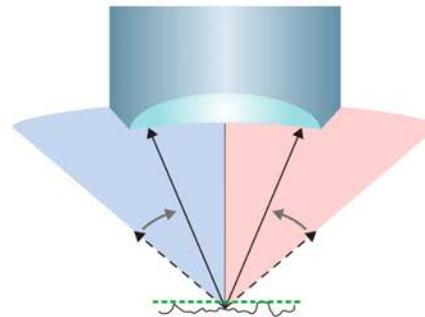


Fig. B : Le produit d'éclairage structuré et la structure de l'échantillon normalement non résolvable produisent des franges de moiré enregistrables contenant les informations de l'échantillon à une limite double de la limite de résolution classique.

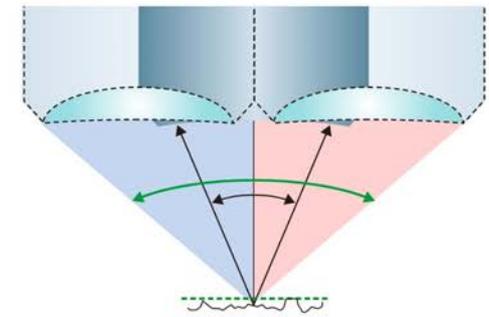
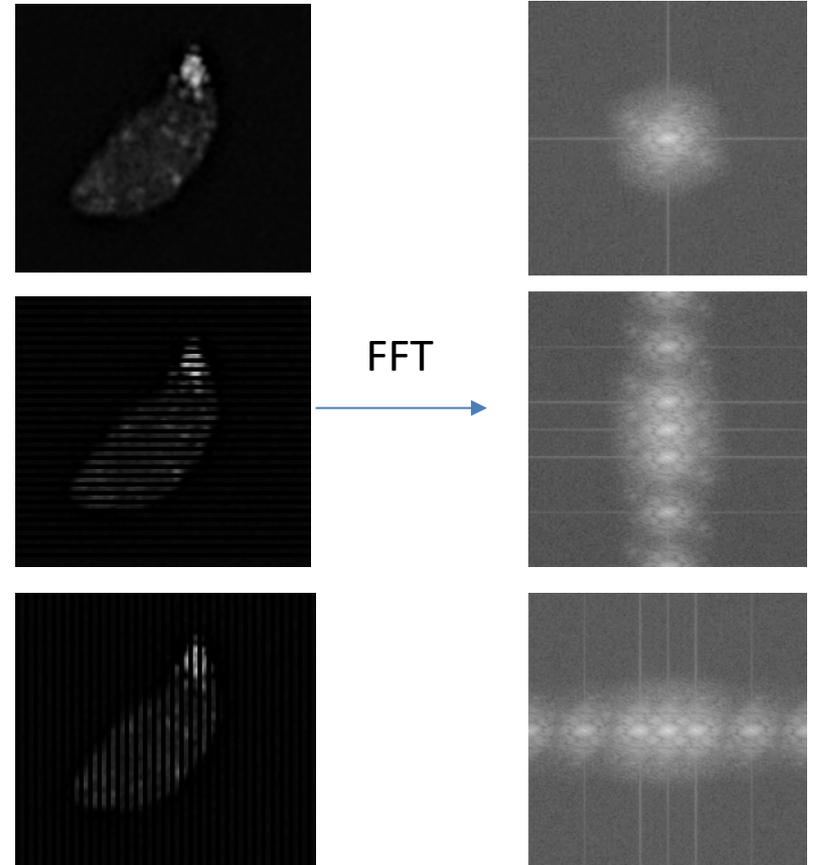
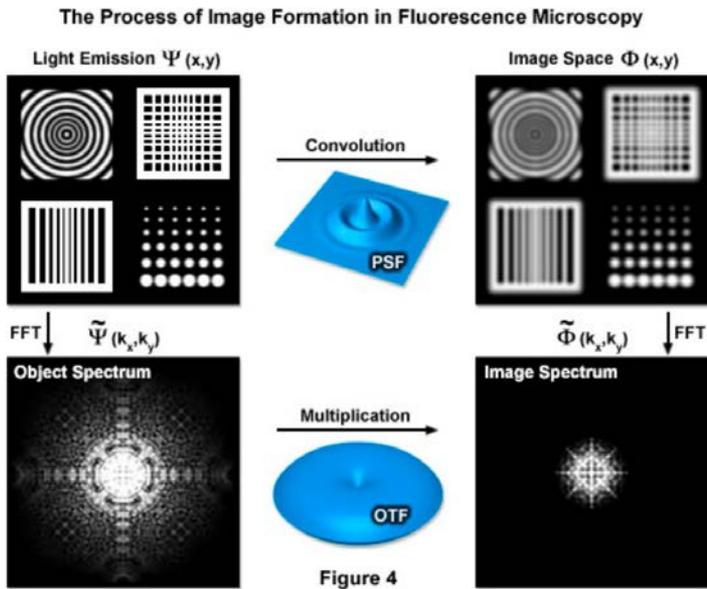


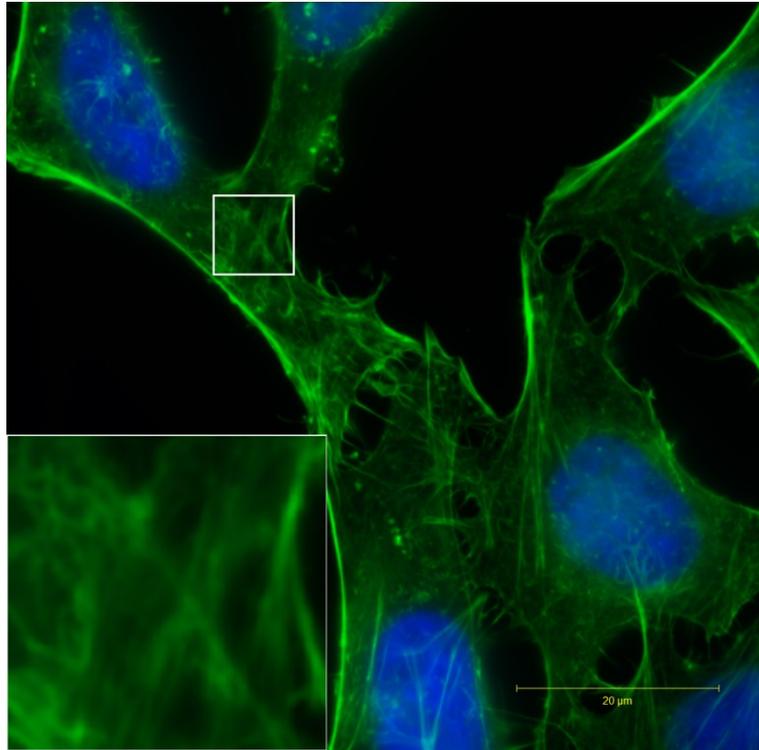
Fig. C : Obtention d'images d'une résolution équivalente à celle prise avec des objectifs d'environ le double de la NA.

SIM - Structured Illumination Microscopy – Principle

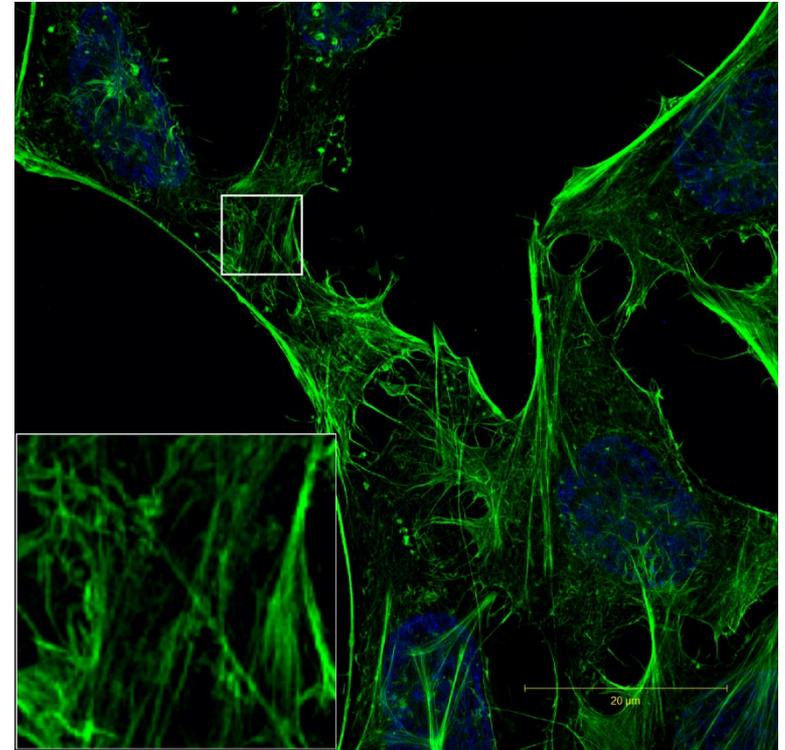


SIM – Structured Illumination Microscopy - Exemples

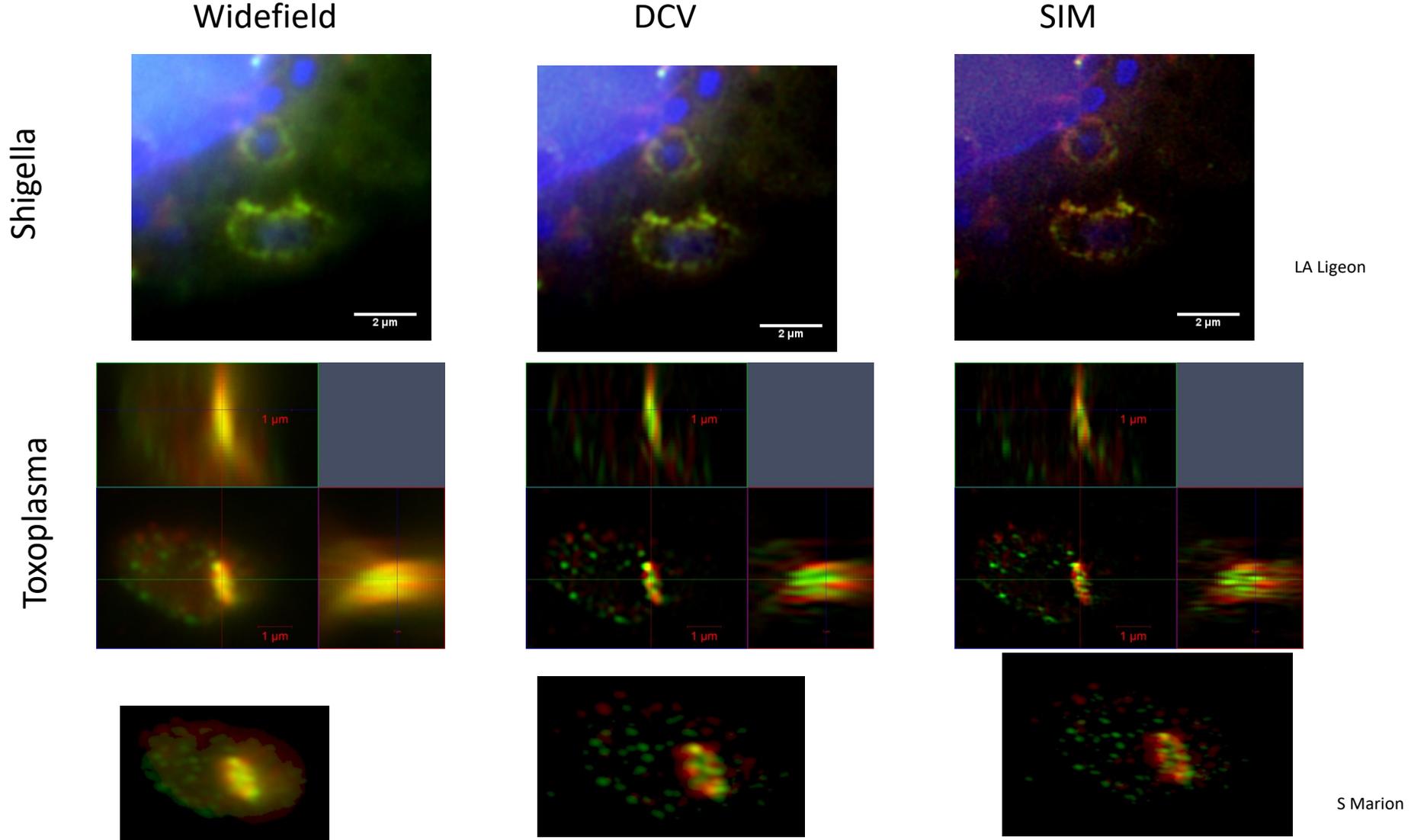
Widefield



SIM



SIM – Structured Illumination Microscopy - Exemples



SIM – Structured Illumination Microscopy - Avantages / Inconvénients

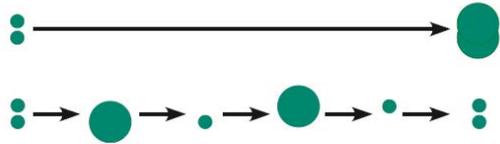
Avantages :

- Gain en résolution en x,y et z : technique 2 fois plus résolue que la microscopie confocale
- Compatible avec des fluorophores utilisés classiquement en microscopie (à condition qu'ils ne soient pas trop sensibles au bleaching)

Inconvénients :

- Nécessité de réaliser plusieurs images du même plan (15 positions différentes de la grille (élément structurant))
- Algorithme de calcul pouvant générer des artefacts

PALM – Photo – Activated Localization Microscopy



Sequential localization measurements result in higher effective resolution.

Illumination simultanée :
Impossible de discriminer deux sources ponctuelles très proches

Illumination séquentielle :
Discrimination possible

Travail avec des molécules fluorescentes présentant 2 états différents : Activé ou non activé

Molécules photoactivables

- Etat OFF : pas d'émission de fluorescence
- Etat ON : Emission de fluorescence

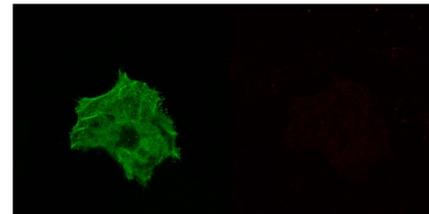
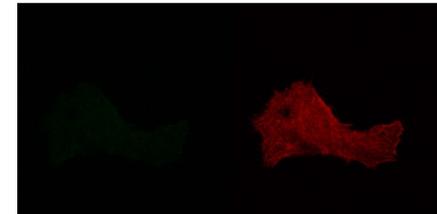
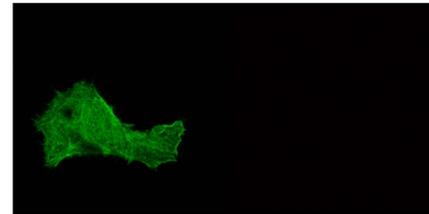
Molécules photoswitchables

- Etat OFF : Fluorescence à une longueur d'onde λ_1
- Etat ON : Fluorescence à une longueur d'onde λ_2

tdEOS - Actin

Avant PA

Après PA



Molécules photoactivables ou photoswitchables

Table 1

Selected PALM PA-FP candidates and relevant photo properties.

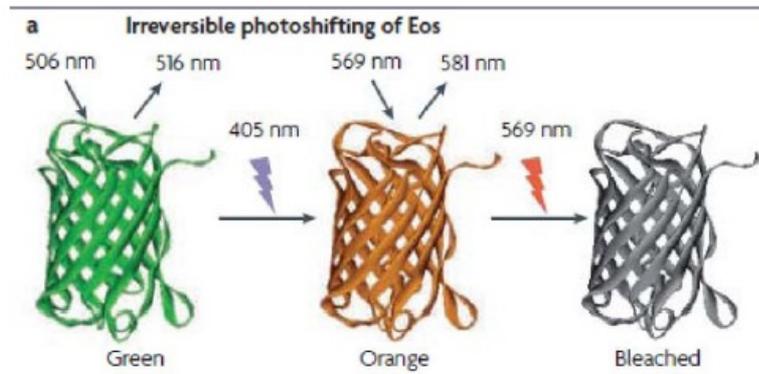
| Fluorescent protein | Molecular form and weight (kDa) ^a | Excitation/Emission (nm) | Relative brightness ^b | Photo-stability ^c | Contrast ratio | Reference |
|---------------------|--|--------------------------|----------------------------------|------------------------------|----------------|-----------|
| mPA-GFP | Monomer 26.9 | 504/517 | 13746 | ++ | 70 | [26] |
| Dronpa | Monomer 25.5 | 503/518 | 80750 | +++ | NR | [27] |
| PA-mCherry1 | Monomer 26.7 | 564/595 | 8280 | ++ | 4000 | [28] |
| tdEos (G) | Dimer 52.9 | 506/516 | 59150 | ++ | NR | [29,30] |
| tdEos (R) | | 569/581 | 29760 | +++ | | |
| mEos2 (G) | Monomer 24 | 506/519 | 47040 | ++ | NR | [30] |
| mEos2 (R) | | 573/584 | 30360 | +++ | | |
| mKikGR (G) | Monomer 26.5 | 505/515 | 33810 | + | ~400 | [31] |
| mKikGR (R) | | 580/591 | 17640 | ++ | | |
| Kaede (G) | Tetramer 25.7 | 508/518 | 86944 | ++ | 2000 | [32] |
| Kaede (R) | | 572/580 | 19932 | +++ | | |
| Dendra2 (G) | Monomer 25.3 | 490/507 | 22500 | ++ | 300 | [33] |
| Dendra2 (R) | | 553/573 | 19250 | +++ | | |
| PS-CFP2 (C) | Monomer 27 | 402/468 | 8600 | ++ | 1500 | [34,35] |
| PS-CFP2 (G) | | 490/511 | 10810 | ++ | | |

NR, not reported.

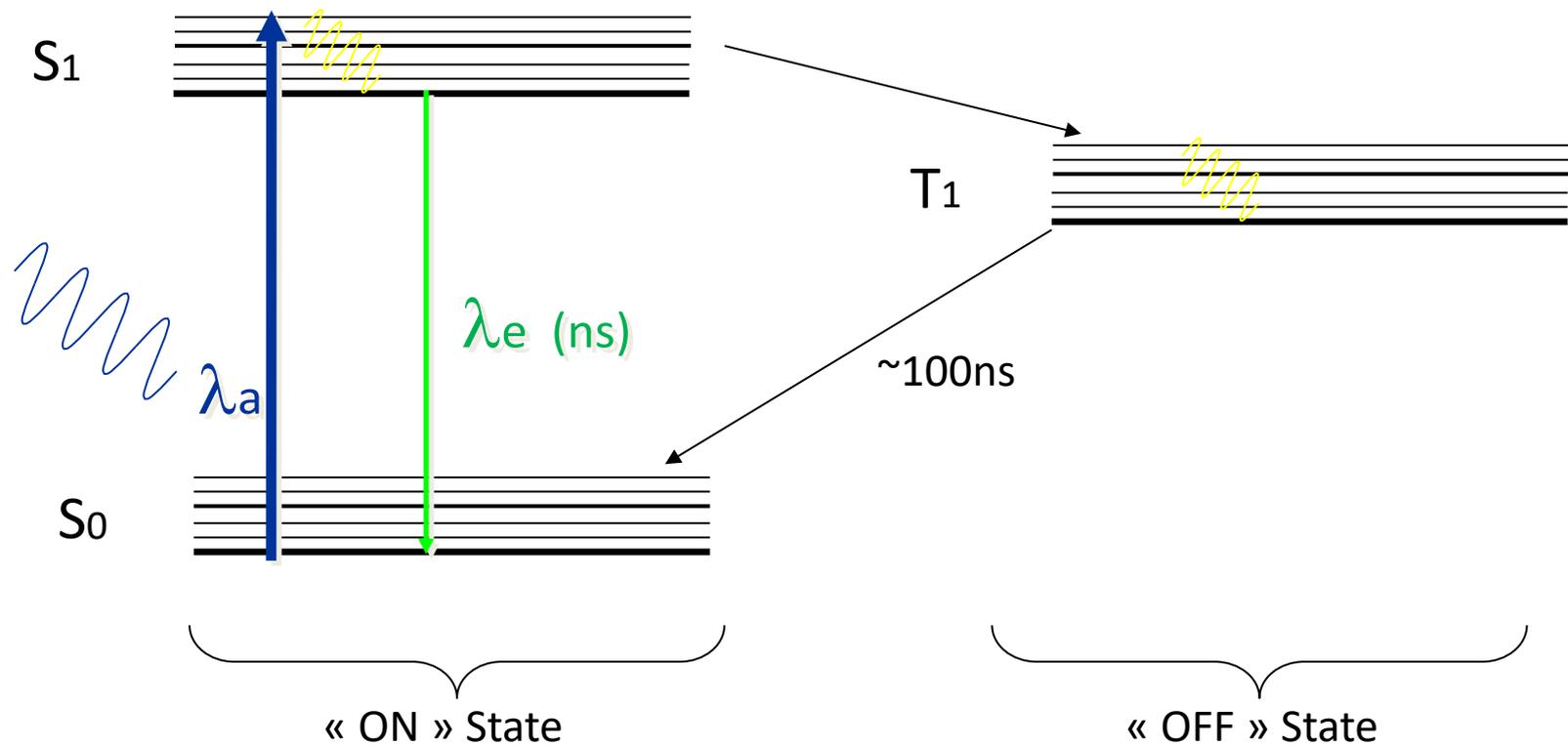
^a multimeric state as reported, molecular weights as calculated from protein sequence.

^b brightness calculated as the product of extinction coefficient and quantum yield.

^c Stability measurements are from reference [30] and from Zeiss online campus resource.



(d)STORM – Stochastic Optical Reconstruction Microscopy



(d)STORM – Stochastic Optical Reconstruction Microscopy

Milieux

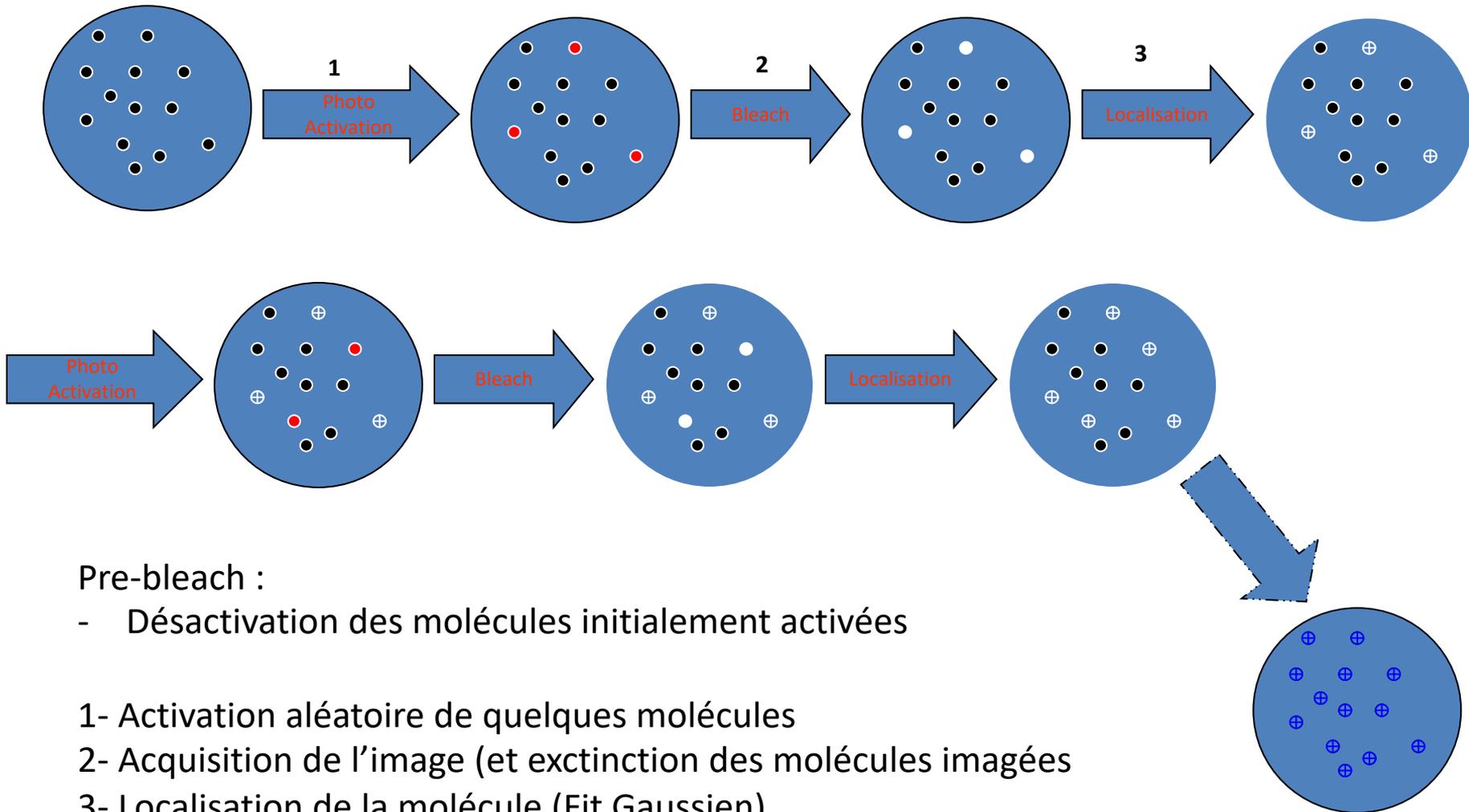
| Laser | Fluorophore | Embedding Media | | | |
|-------|--------------------------------|------------------------|---------------------------------|------------------|-----------------------------|
| | | Aqueous Media | | Hardening | |
| | | Medium 1 MEA in PBS | Medium 2 Glucose-Oxidase Mix | Medium 3: PVA | Medium 4* Resin LR-White |
| 488 | AlexaFluor [®] 488 | + | | | |
| | Atto 520 | + | | | |
| 532 | AlexaFluor [®] 532 | + | | | |
| | Atto 532 | | + | + | + |
| | AlexaFluor [®] 546 | | | + | |
| | Rhodamine 6G | | + | + | + |
| | Atto 565 | | | + | |
| | AlexaFluor [®] 568 | + | | | |
| 642 | AlexaFluor [®] 647 | + | | | |

*Note: Embedding Medium 4 has been reported to be suitable for tissue sections. Testing of LR-White is ongoing and full performance cannot be guaranteed until the tests are completed.

En utilisant des milieux tampon particuliers, on parvient à créer deux états pour des molécules fluorescentes utilisées classiquement en microscopie. Lorsqu'on veut faire du multimarquage, il faut trouver un milieu compatible avec plusieurs molécules fluorescentes

PALM Principle

Photo-Activated Localization Microscopy



Pre-bleach :

- Désactivation des molécules initialement activées

1- Activation aléatoire de quelques molécules

2- Acquisition de l'image (et extinction des molécules imagées)

3- Localisation de la molécule (Fit Gaussien)

...

Répétition des étapes jusqu'à ce que toutes les molécules aient été localisées

PALM Principle

Photo-Activated Localization Microscopy

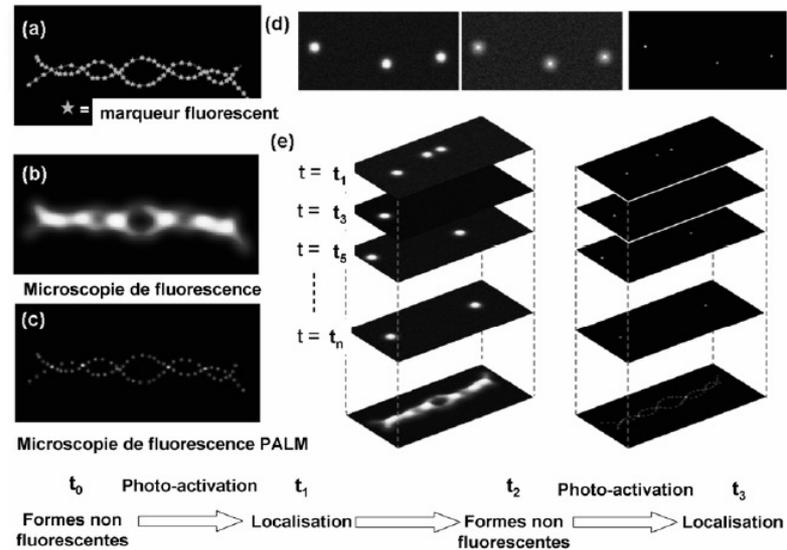


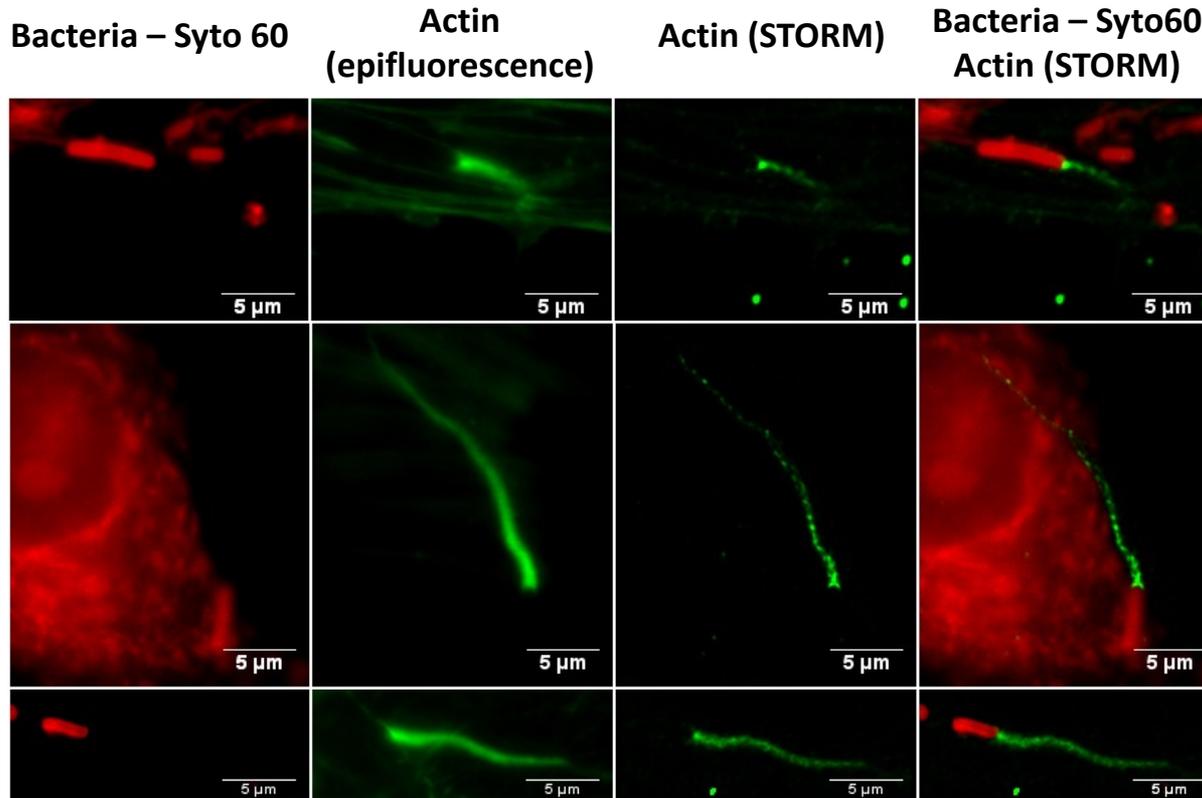
Figure 13 : Microscopie PALM appliquée pour la visualisation d'un double brin d'ADN.

Acquisition de séquences d'images.

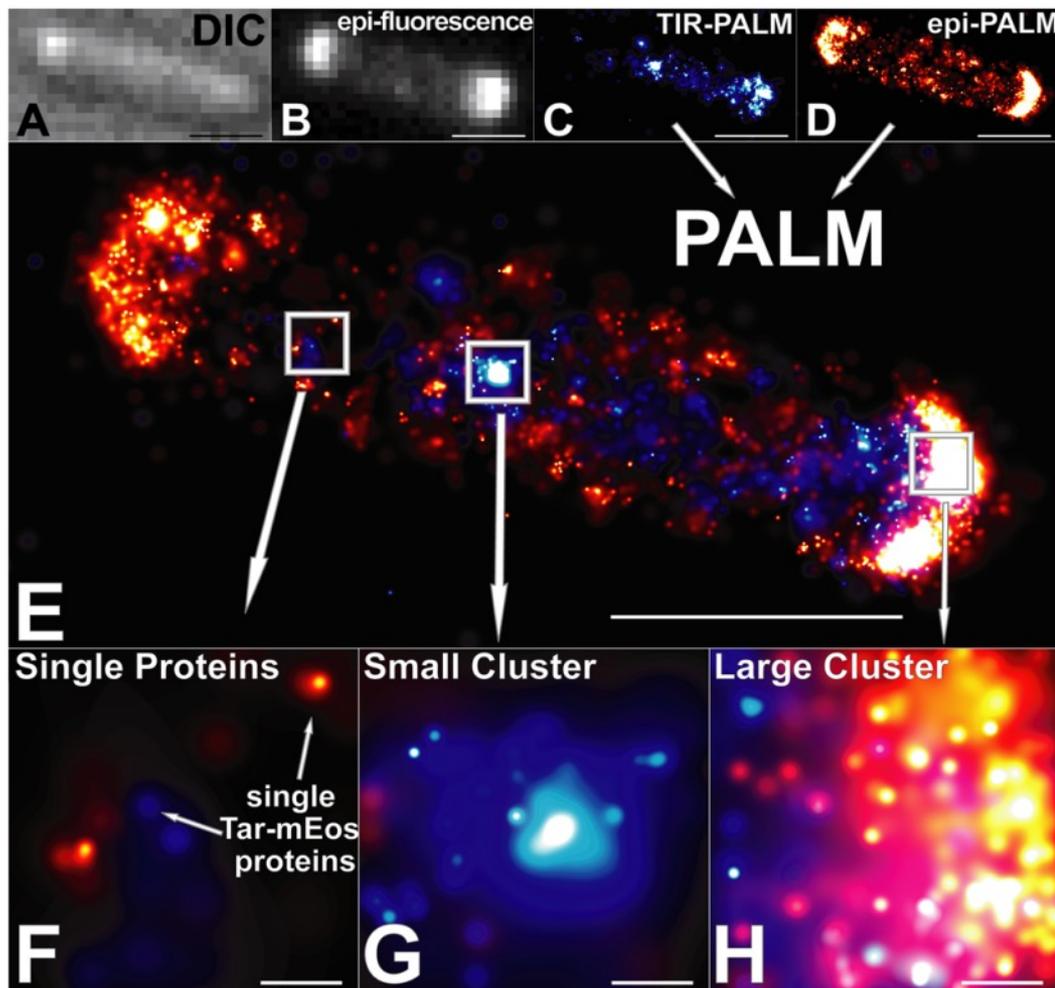
Pour, par exemple Actin – tdEOS :

- 1 image : environ 20 ms
- 5 000 à 10 000 images pour reconstruire une image PALM (Super Résolution)

STORM - Examples



M Popoff
A Bongiovanni



Self-Organization of the *Escherichia coli* Chemotaxis Network Imaged with Super-Resolution Light Microscopy

Derek Greenfield^{1,2.}, Ann L. McEvoy^{1.}, Hari Shroff^{3,}
Gavin E. Crooks^{2,} Ned S. Wingreen^{4,} Eric Betzig^{3,} Jan Liphardt^{1,2,5*}

Figure 2. *E. coli* *Dtar* cell with *mEos*-labeled *Tar*. (A) Differential interference contrast (DIC) image of a single cell. (B) Diffraction-limited epifluorescence (epi). (C) PALM image in TIR-illumination. Each protein is represented as a 2-D Gaussian distribution whose width is the positional error for that protein. (D) PALM image in epi-illumination, taken after *Tar-mEos* proteins in the TIR region are bleached. (E) Superposition of (C) and (D). (F) Zoom of single proteins ($n = 44$ *Tar* proteins) in left boxed region of (E). (G) Zoom of small cluster ($n = 241$ *Tar* proteins) in middle boxed region of (E). (H) Zoom of large polar cluster ($n = 722$ *Tar* proteins) in right boxed region in (E). Scale bar in (A–E) indicates 1 μm . Scale bar in (F–H) indicates 50 nm. doi:10.1371/journal.pbio.1000137.g002

PALM - STORM

Avantages / Inconvénients

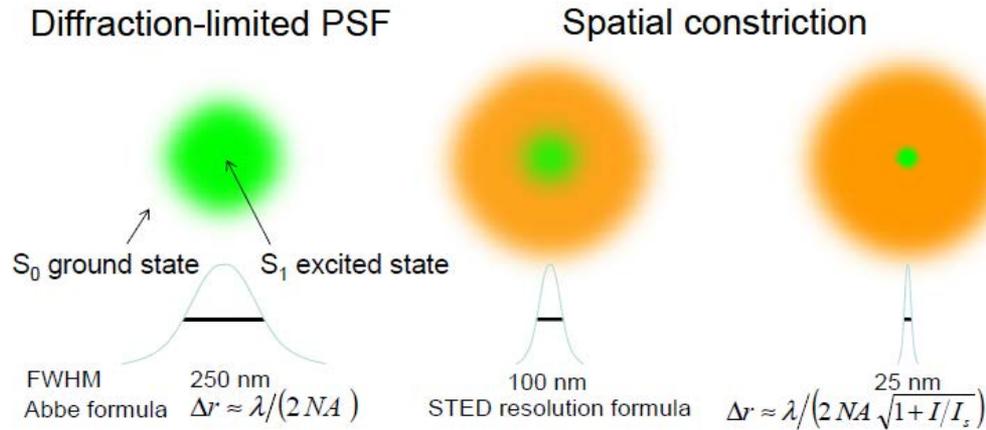
Avantages :

- Gain en résolution en x,y et z : technique 10 fois plus résolue que la microscopie confocale (20 – 30 nm)

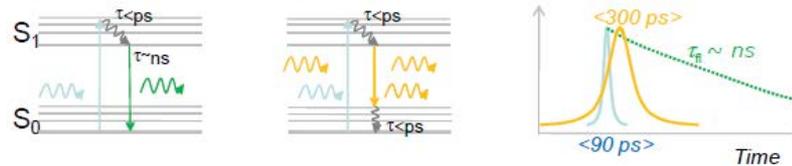
Inconvénients :

- Utilisation de sondes spécifiques (activables)
- Longs temps d'acquisition
- Traitement mathématique complexe
- Multimarquage complexe

STED - Stimulated Emission Depletion



..by fluorescence quenching



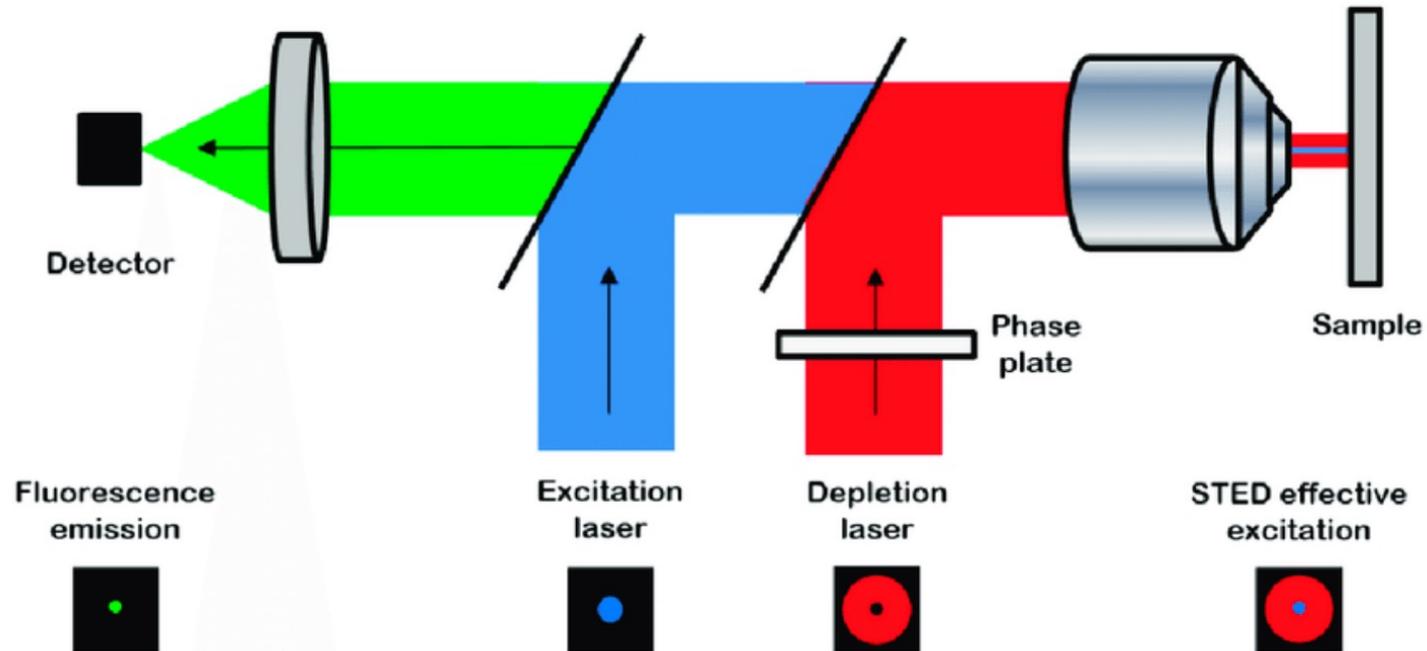
Objectif :

Restreindre l'émission de fluorescence à une zone plus petite que la PSF.

Faible puissance d'excitation

Forte puissance de déplétion (300 mW sortie d'objectif)

STED – Stimulated Emission Depletion

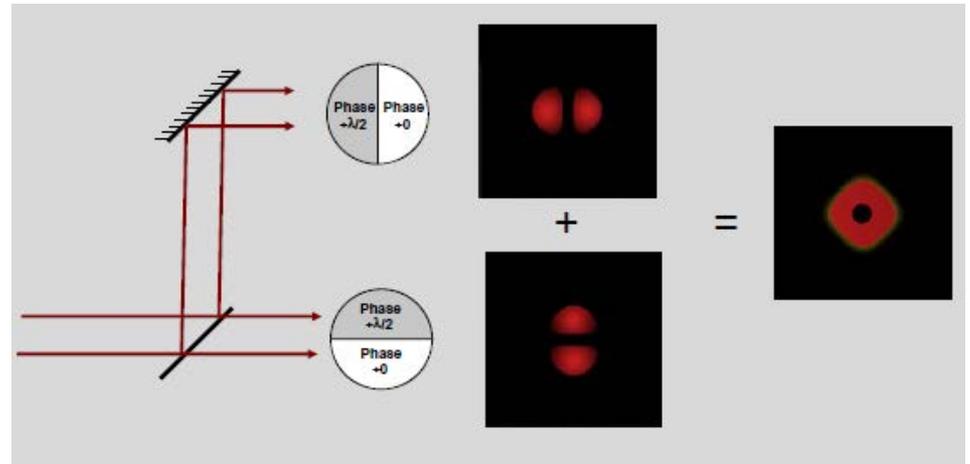


[Fluorescent Nano-Probes to Image Plant Cell Walls by Super-Resolution STED Microscopy](#)

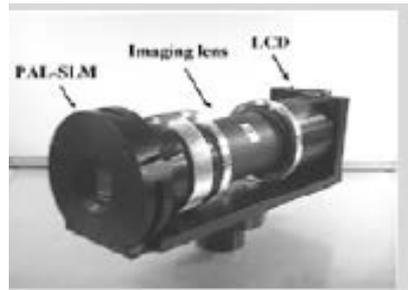
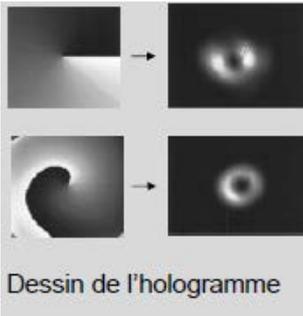
Formation du « donut »

2 Lames de phase :

Interférence \rightarrow Opposition au centre du point de focalisation

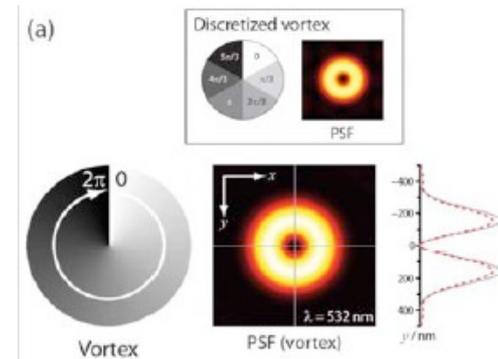


Palm-SLM:
Hologramme



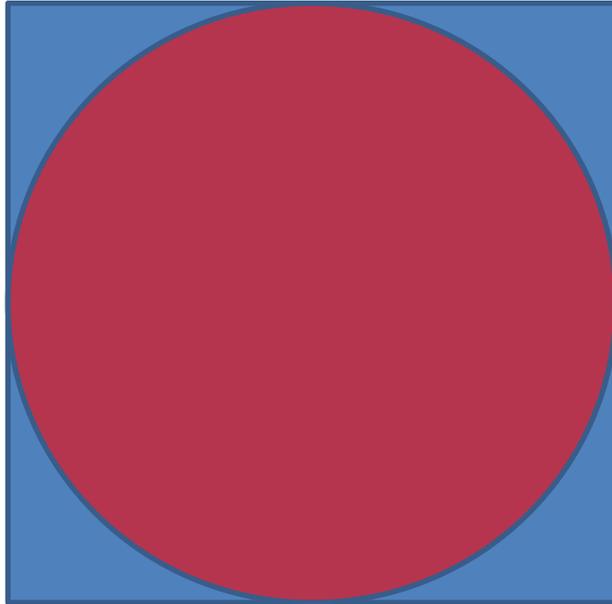
Vortex Plate:

Variation de phase continue ou discrète



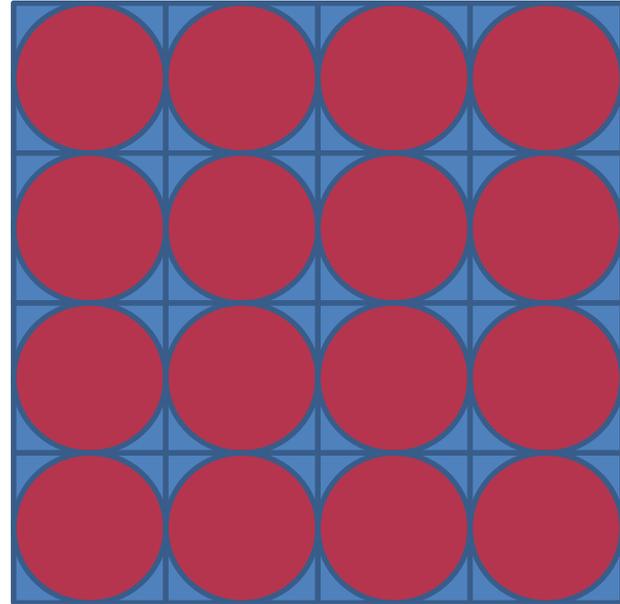
STED – Stimulated Emission Depletion

Confocal



240 nm

STED



60 nm

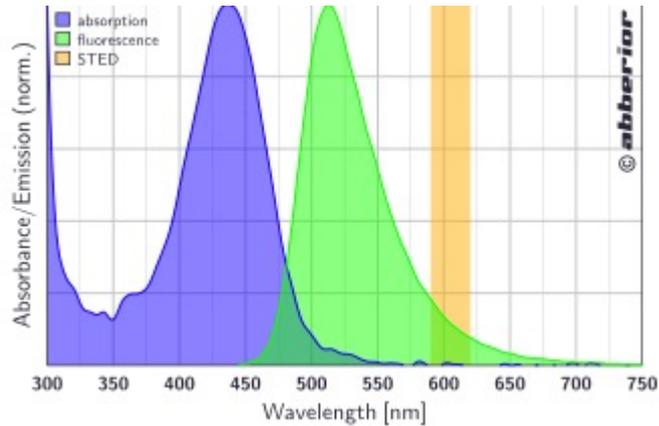
Gain en résolution X4

Augmentation du nombre de pixels de l'image (x16)

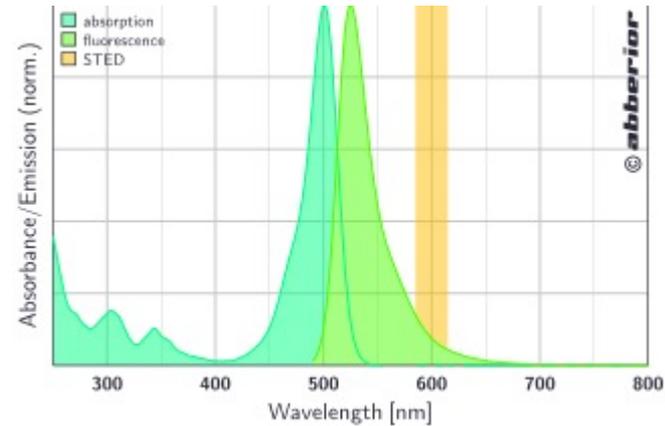
Augmentation du temps d'acquisition

STED – Fluorophores

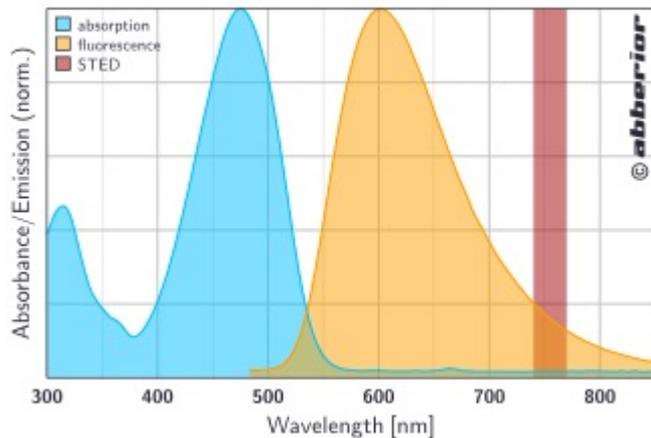
STAR 440



STAR 488



STAR 470



- La longueur d'onde du faisceau STED doit être incluse dans le spectre d'émission de la molécule
- Le faisceau de déplétion STED ne doit pas réexciter la molécule (loin du spectre d'excitation)

STED – Fluorophores

Possibilité de faire du multimarquage

- Utiliser 2 lasers de depletion différent
- Utiliser un fluorophore avec un long shift de Stoke's

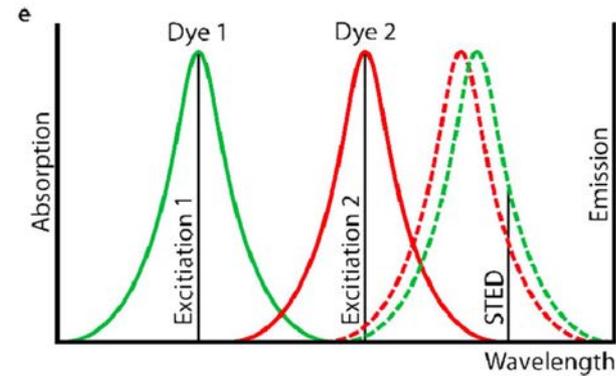
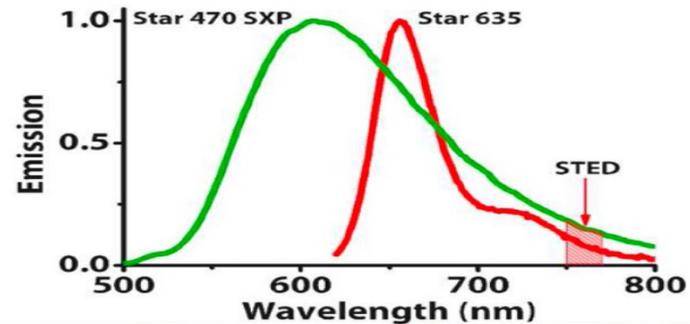
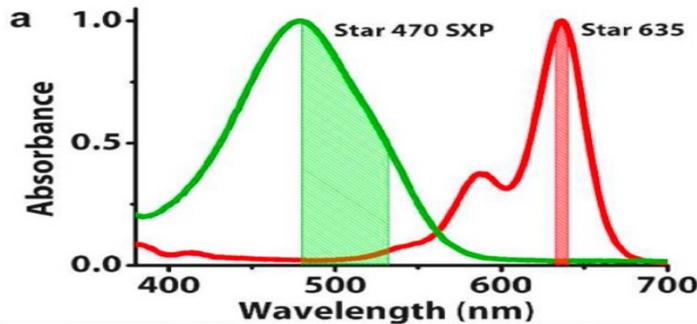
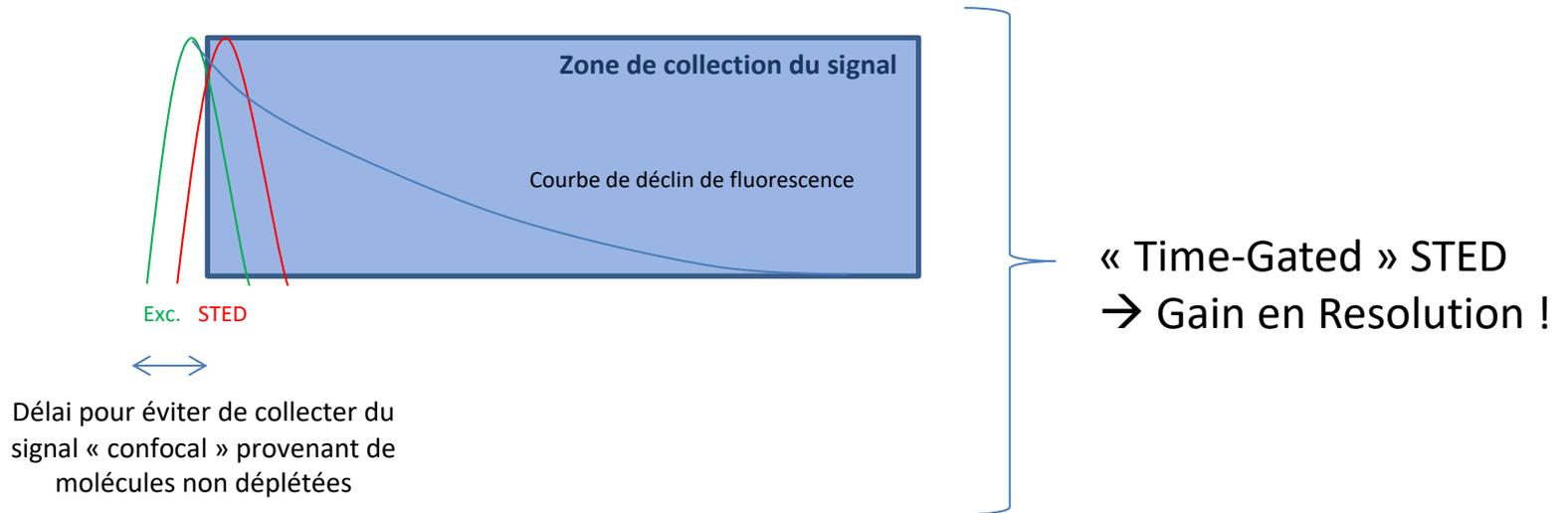
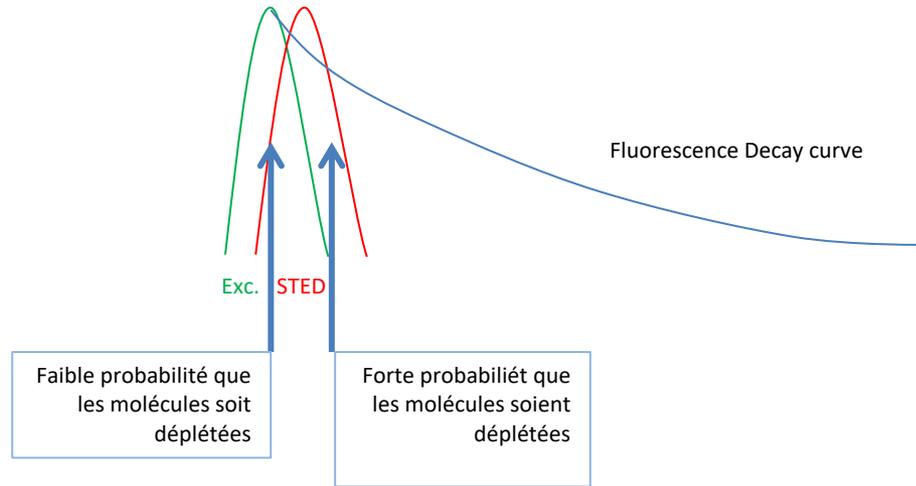


Figure 1. Physical conditions, setup scheme, typical focal spot and two-color imaging scheme for STED microscopy [4]: (a) energy diagram of an organic fluorophore; (b) depletion of the excited state S_1 with a STED pulse of increasing intensity (I_{STED}); (c) sketch of a point-scanning STED microscope; (d) fluorescent spots in the STED and confocal microscopes; (e) absorption spectra (continuous lines) and emission spectra (broken lines) of a large Stokes shift dye (green) and a dye with a small Stokes shift (red); both dyes can be depleted with one wavelength (STED).

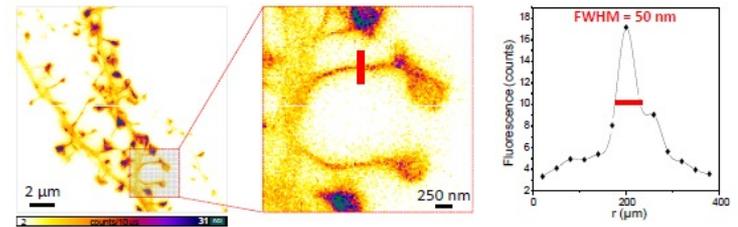
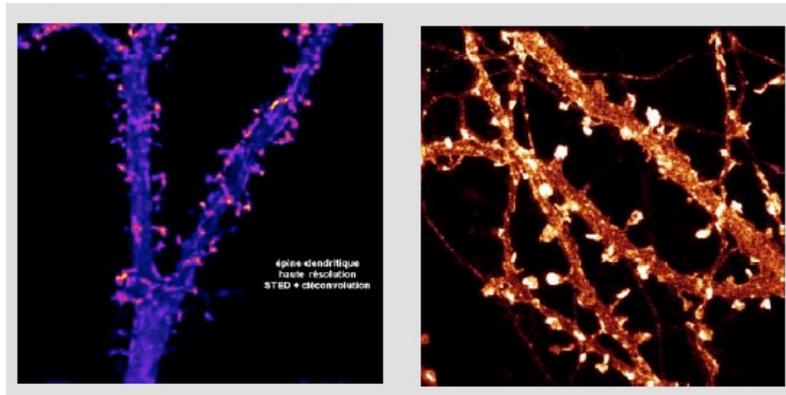
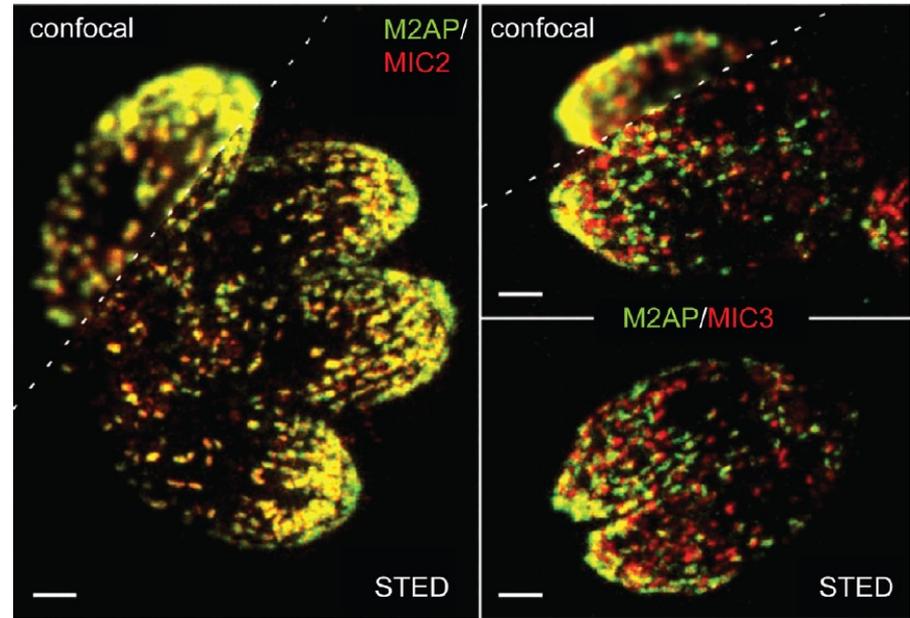
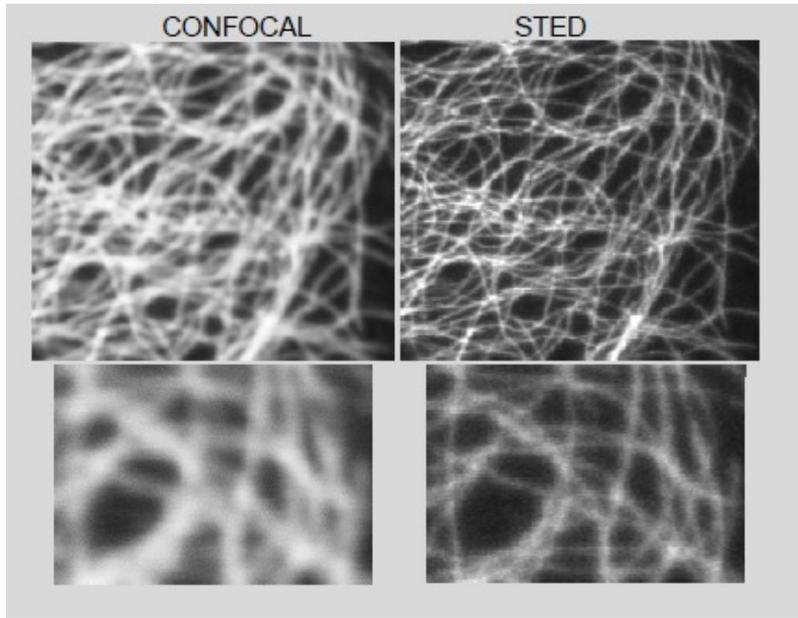


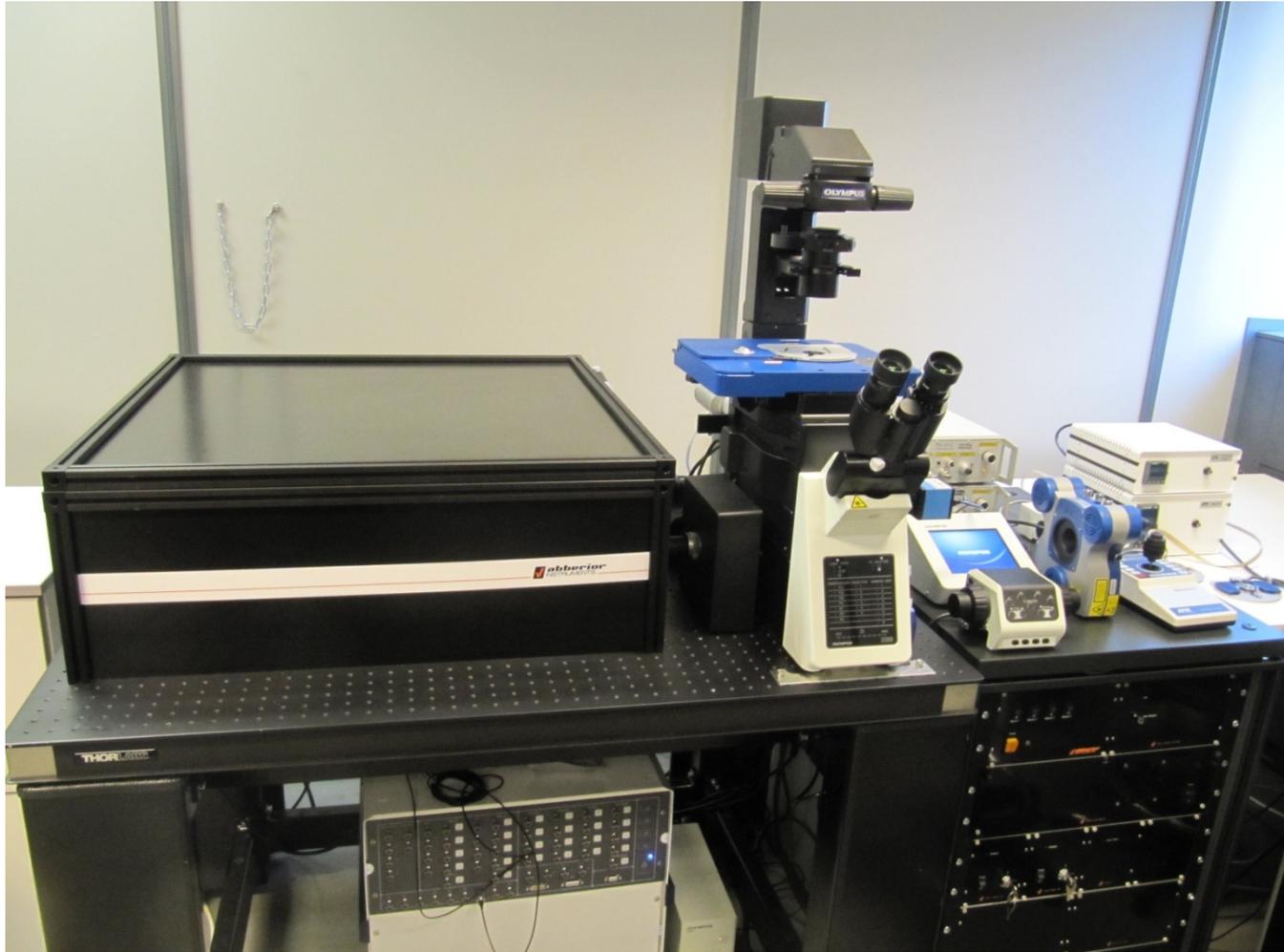
Fluorescent dyes with large Stokes shifts for super-resolution optical microscopy of biological objects: a review

Gated STED



STED – Exemples





STED

Avantages / Inconvénients

Avantages :

- Gain en résolution en x,y et z : technique 4-5 fois plus résolue que la microscopie confocale (50 – 70 nm)
- Vitesse d'acquisition (plus lent que le confocal, mais beaucoup plus rapide que le PALM)
- Double marquage possible, mais complexe dans certains cas

Inconvénients :

- Lasers de déplétion puissants. Risque de bleacher l'échantillon

| | STED CW | STED pulsed | PALM | STORM/GSDIM | SIM |
|------------------|--|--|--|-----------------------------------|--------------------------------------|
| Résolution x,y | | 70nm (90-100 for the 2 nd channel) | 20-30 nm (fixed sample) 70 nm (living sample) | | 100nm – SIM 2D 110-120nm – SIM 3D |
| Résolution z | 600 nm | 600 nm (100nm possible if STED-3D) | | | ~350 nm |
| Samples | Living or fixed | Fixed | Living or fixed | Fixed | Fixed |
| Fluorophores | Fluorescent proteins or classical fluorophores | ATTO655, ATTO647N, | Photo activable ou photoswitchable proteins | Classical fluorophores type Alexa | All classical fluorophores |
| Multichannel | GFP/YFP | 2 nd fluorophore with along Stoke's shift | | Yes | Yes |
| Number of images | 1 | 1 | 10000images, 100000molécules. Possible stack de 4000 | ~10000 images | 9 pour 2D, 15 pour 3D |

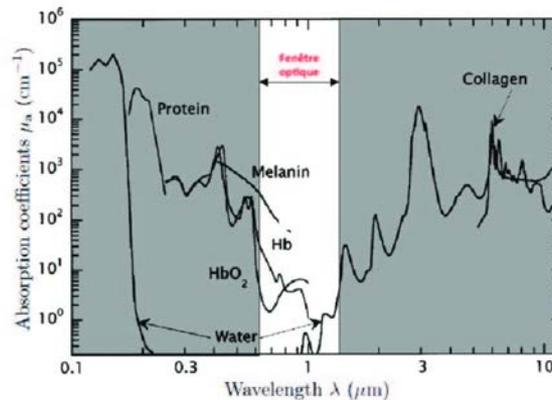
Imagerie tissulaire

Microscopie confocale

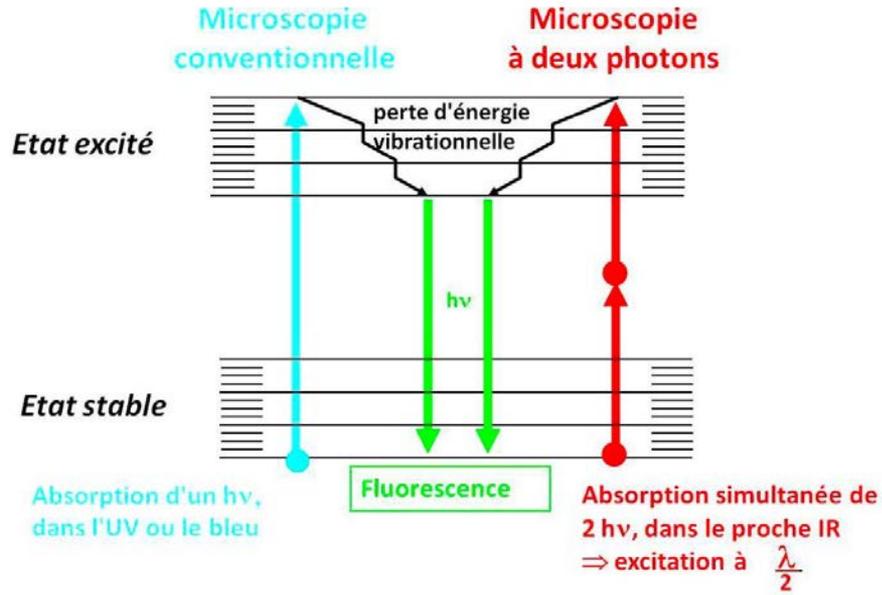
- Phototoxicité dans toute l'épaisseur de l'échantillon
- Photoblanchiment de l'échantillon
- Faible pénétration dans les tissus (< 80 μm)

Microscopie multi photons

- Limitation de la toxicité et du blanchiment au plan focal
- Pénétration plus importante dans les tissus (moins d'absorption pour les longueurs d'onde utilisées)



Microscopie multi photon

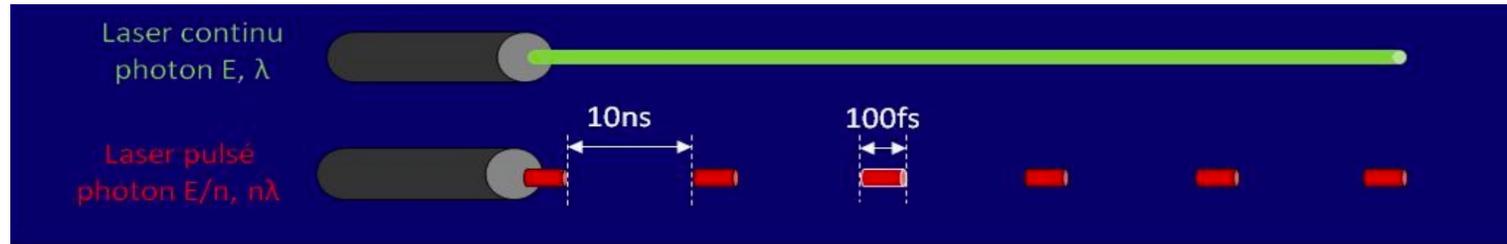


Pour amener la molécule à son excité, on utilise deux photons d'énergie moitié qui sera absorbés simultanément.

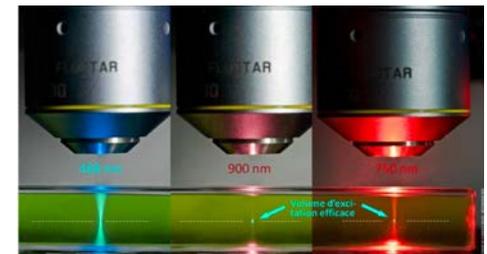
L'énergie étant inversement proportionnelle à la longueur d'onde, on travaillera avec des longueurs d'onde deux fois plus élevées

Microscopie multi photon

Pour générer une absorption 2 photons, on utilisera un laser pulsé qui génère des pulses de l'ordre de 100fs, à une fréquence de l'ordre de 80 MHz. Les photons seront temporellement confinés.



La probabilité d'absorption de 2 photons simultanément sera maximale au niveau du plan focal. Les plans adjacents ne seront pas excités. La focalisation au travers de l'objectif permet le confinement spatial des photons.



Microscopie multi photon

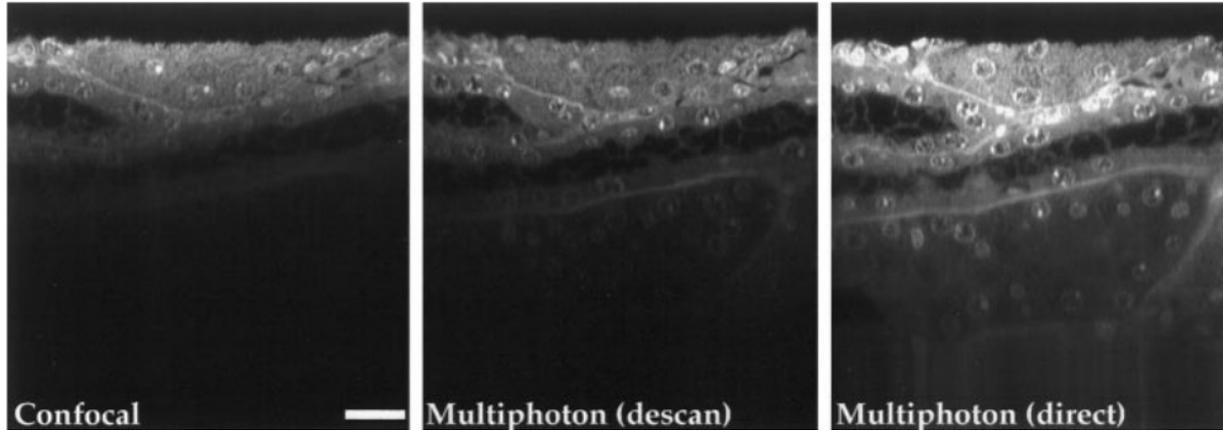
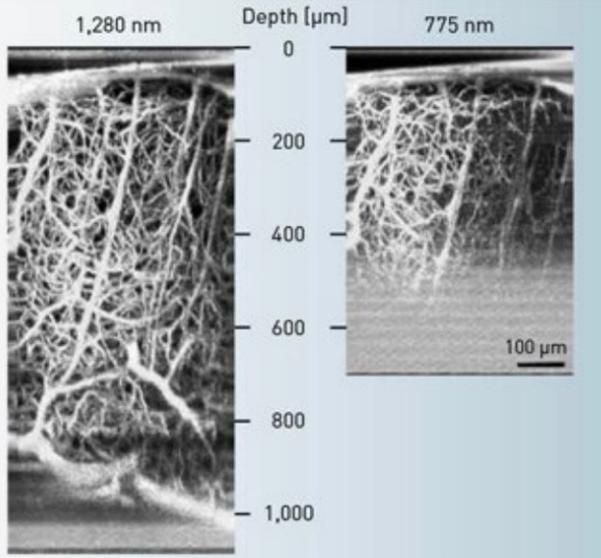


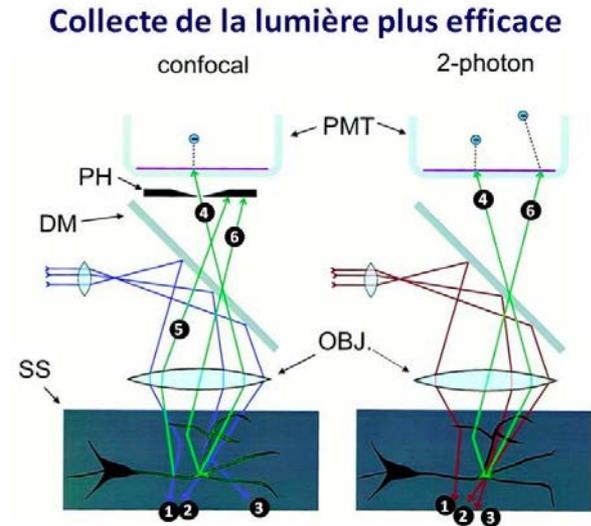
FIGURE 2 Comparison of imaging penetration depth with different imaging modes. Shown are XZ profiles through an acid-fucsin-stained monkey kidney pathology sample imaged through a depth of $140\ \mu\text{m}$ with confocal (*left*), multiphoton descanned (*middle*), and multiphoton direct detection (*right*) microscopy. The imaging penetration depth with multiphoton (descanned, *middle*) relative to confocal (*left*) imaging is improved at least twofold. Direct detection (*right*) provides increased signal detection and, therefore, increased depth of imaging. XZ images were collected at $0.3\text{-}\mu\text{m}$ pixel resolution using a Kalman 3 collection filter. Scale bar, $20\ \mu\text{m}$

Multiphoton Excitation Provides Optical Sections from Deeper within Scattering Specimens than Confocal Imaging

Microscopie multi photon



Two-photon microscopy depth limit. The signal-to-background ratio limits the maximum penetration depth in 2PM. In the mouse neocortex, the depth limit at 775-nm and 1,280-nm excitation is about 700 and 1,600 μm, respectively.



- 1-3 : photons d'excitation diffractés
- 4 : photons d'émission ballistiques (non-diffractés)
- 5 : photons d'émission hors plan focal
- 6 : photons d'émission du plan focal mais diffractés

Denk and Svoboda, 1997,
Neuron 18, 351-357

Going Deep: Brain Imaging with Multi-Photon Microscop

Microscopie multi photon

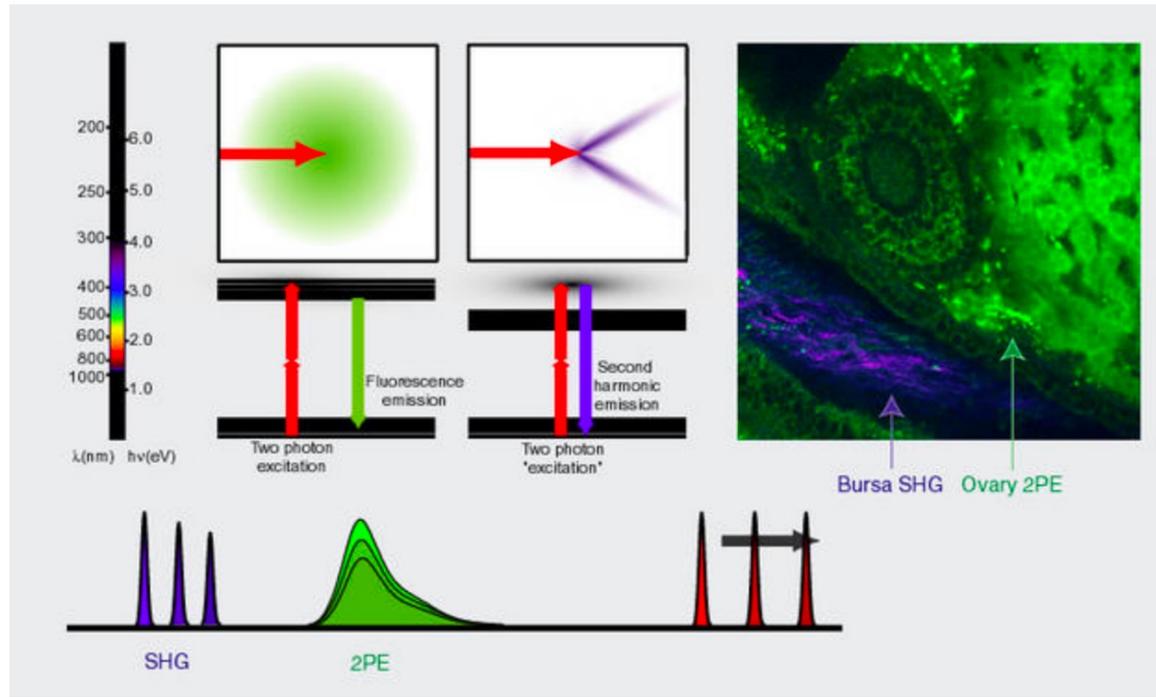
Avantages :

- Excitation strictement localisée au plan focal
 - Diminution de la phototoxicité et du photoblanchiment
- Meilleure pénétration dans les tissus
- Collecte de photons plus efficace (Rapport S/B ++)

Inconvénients :

- élévation de température au point d'excitation
- Risque plus élevé d'abîmer l'échantillon (lasers très puissants)
- Spectres d'excitation et d'émission plus larges qu'en mono photon
- Besoin d'une optique compatible avec les rayons infra rouges

Microscopie multi photon - SHG



La génération de Second Harmonique est un processus optique non linéaire. Deux photons sont « combinés » pour former des photons présentant deux fois l'énergie initiale (et donc la moitié de la longueur d'onde)

Microscopie multi photon - SHG

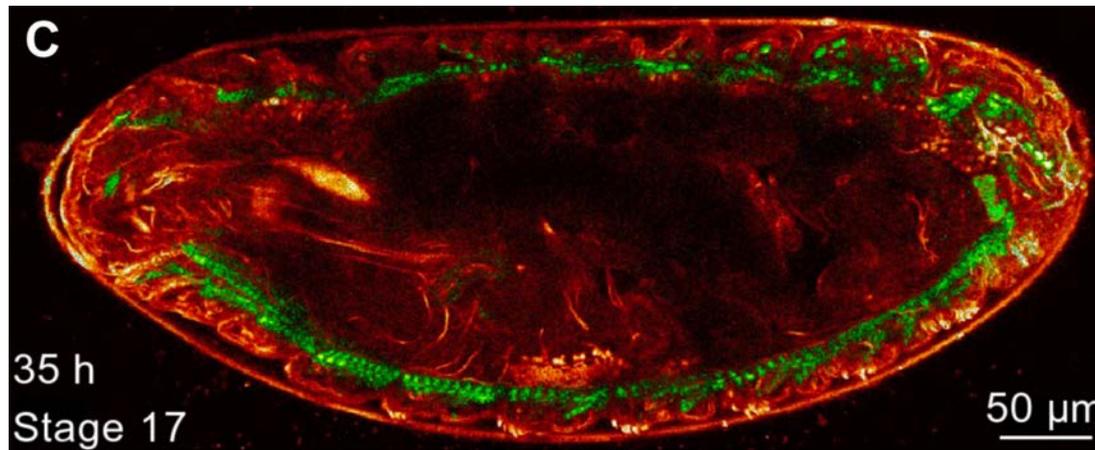
L'émission de signal SHG est possible uniquement dans un milieu présentant une organisation non centrosymétrique. Le signal est émis préférentiellement dans la direction du laser incident, contrairement à la fluorescence qui présente un rayonnement isotrope.

De forts signaux endogènes ont été mis en évidence dans le collagène fibrillaire, les myofilaments, les faisceaux polarisés de microtubules, ou des granule d'amidon.

Microscopies multi-harmoniques pour
l'imagerie structurale de tissus intacts

Microscopie multi photon - THG

La microscopie THG permet de visualiser toutes les hétérogénéités optiques de taille micrométriques dans les tissus : interfaces cellulaires, vésicules lipidiques. Il s'agit d'une imagerie morphologique, qui permet principalement de visualiser les couches lipidiques et les contours des cellules de l'épiderme.



2D THG-SHG imaging at a wavelength of 1180 nm of a wild-type *Drosophila* embryo during 36 hours starting from stage 5 up to the larvae stage (i.e. until hatching) and imaged during 3.3 s every 150 s, corresponding to an imaging rate of 2%. (A–C) representative 2D THG-SHG images at different stages of the development, with stage and time after the beginning of the acquisition mentioned in the bottom left. The look-up-table used to represent the SHG and THG signals are displayed below. Scale bar = 50 μm .

Mitigating Phototoxicity during Multiphoton Microscopy of Live *Drosophila* Embryos in the 1.0–1.2 μm Wavelength Range

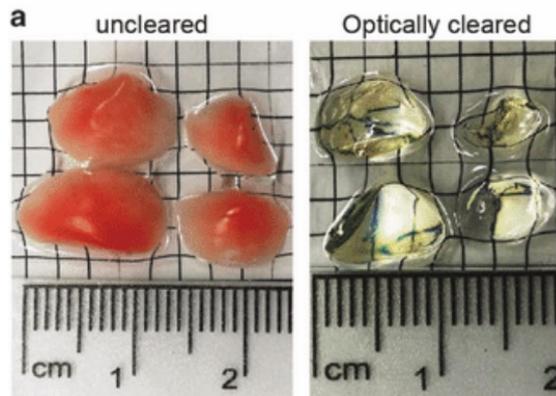
Transparisation des échantillons

Imagerie en profondeur difficile à cause de la diffusion et de l'absorption de la lumière par les tissus.

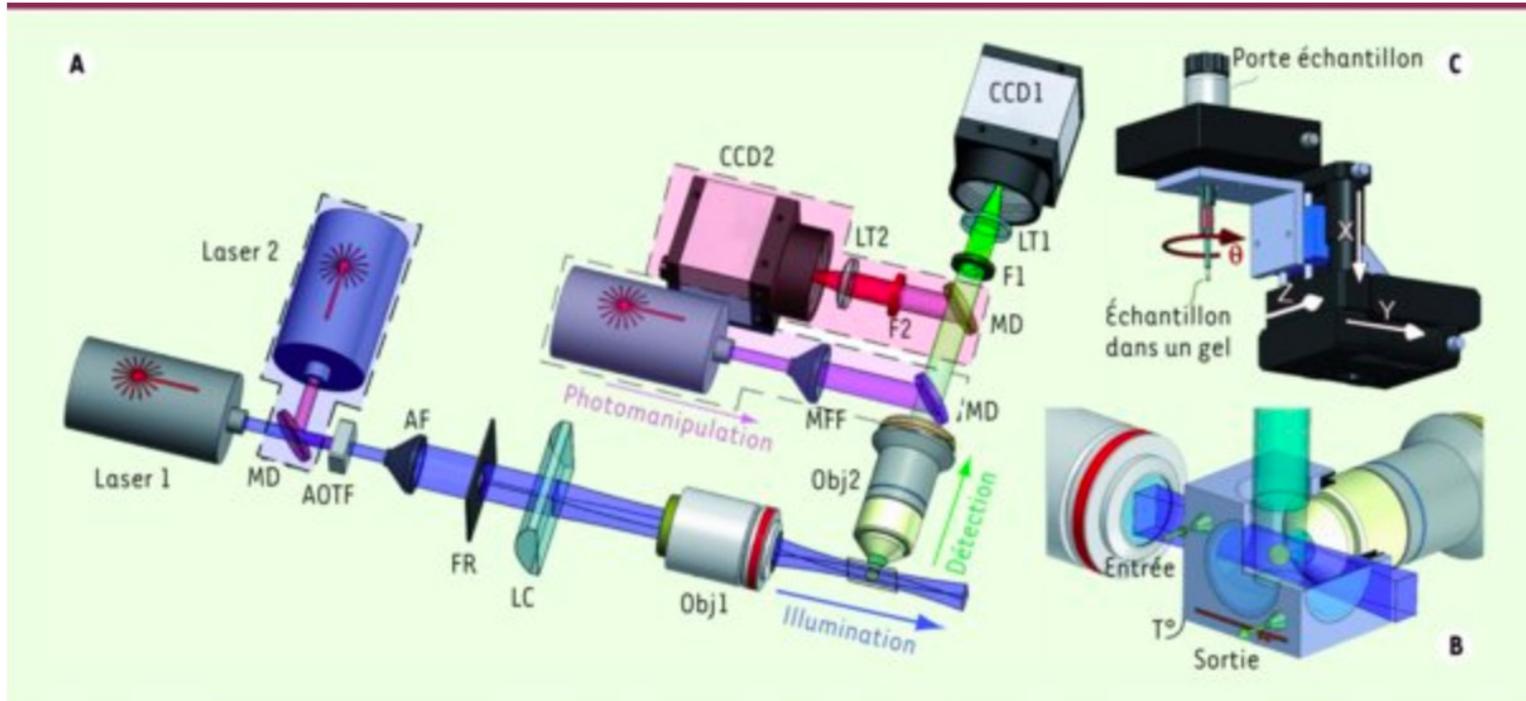
Les échantillons biologiques sont souvent épais et denses optiquement. Chaque molécule biologique présente un indice de réfraction différent.

Rendre les échantillons « transparents » permet la visualisation d'organes entiers. Les objectifs des traitements de transparisation sont :

- Suppression de l'opacité des cellules due aux lipides membranaires (sans endommager les cellules)
- Décoloration des pigments
- Homogénéisation des indices de réfraction (limiter les phénomènes de réfraction et diffusion)

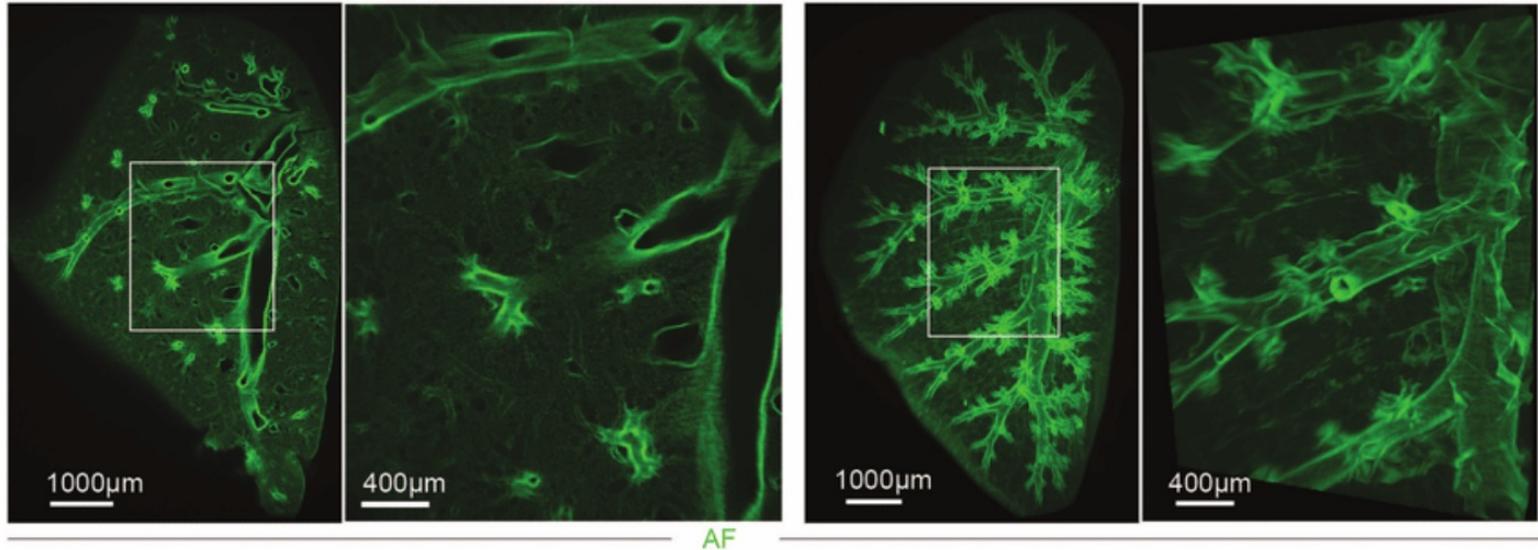


Microscopie Light Sheet



Light-sheet based fluorescence microscopy
The dark side of the sample finally revealed

Microscopie Light Sheet



3DISCO clearing and light sheet microscopy (LiSM) imaging of whole lung lobes. (a) Clearing of separated lung lobes using organic solvents. Separated lung lobes (left) were dehydrated in increasing concentrations of THF followed by optical clearing in DBE (right) before LiSM imaging. (b) Diagrammatic representation of LiSM set-up showing sample orientation, excitation by a thin light sheet and image acquisition. (c, d) Representative LiSM micrographs from 3DISCO-cleared lung lobes, showing sectional and 3D views of an imaged lobe from a wild type (WT) mouse. AF, autofluorescence.

[Application of light sheet microscopy for qualitative and quantitative analysis of bronchus-associated lymphoid tissue in mice](#)