



**TECHNIQUES
DE L'INGÉNIEUR**

Réf. : **BI07200 V1**

Date de publication :
10 mars 2015

Microscopie de fluorescence biomédicale

Cet article est issu de : **Biomédical - Pharma | Technologies pour la santé**

par **Léon ESPINOSA, Yves TOURNEUR**

Mots-clés

molécules fluorescentes |
microscope à fluorescence |
super-résolution | Recherche
biomédicale | industrie
biomédical | Microscopie de
fluorescence à deux photons |
microscopie optique |
fluorescence

Keywords

fluorescent molecules |
fluorescence microscope |
super-resolution | Biomedical
research | biomedical industry |
Two-photon fluorescence
microscopy | optical
microscopy | fluorescence

Résumé La microscopie de fluorescence nécessite d'une part un instrument spécifique et des molécules fluorescentes. Cet article expose ces deux aspects. Cette technique est majoritairement utilisée sur des échantillons biologiques. Les nombreuses sondes pour les molécules biologiques ainsi que les protéines de fusion fluorescentes comme la GFP sont présentées, ainsi qu'une large gamme de techniques : champ large, confocal, super résolution, coupes optiques, protection des échantillons, vidéo microscopie sur matériel vivant. Un tissu industriel dynamique s'est développé autour de grandes entreprises d'instrumentation, des constructeurs des périphériques (caméras, optomécanique, chimie) et des laboratoires de recherche biomédicale, d'optique, et des compagnies pharmaceutiques.

Abstract Fluorescence microscopy is a photonic technique that requires a specific instrument, and fluorescent substances. This article outlines both aspects. This technique is mainly used on biological samples. We describe a battery of probes targeting biological molecules, along with the use of fluorescent fusion proteins such as GFP. A wide range of techniques is described related to the benefits for ease of observation: wide field, confocal, super-resolution optical sections, sample protection, and video microscopy of living material. There is a dynamic industrial base, composed of large instrumentation companies, manufacturers of devices (cameras, optomechanics, chemistry), optical and biomedical research laboratories, and pharmaceutical companies.

Pour toute question :

Service Relation clientèle
Techniques de l'Ingénieur
Immeuble Pleyad 1
39, boulevard Ornano
93288 Saint-Denis Cedex

Par mail :

infos.clients@teching.com

Par téléphone :

00 33 (0)1 53 35 20 20

Document téléchargé le : **06/06/2025**

Pour le compte : **7200048087 - ecole normale superieure de lyon // 140.77.168.36**

© Techniques de l'Ingénieur | Tous droits réservés

Microscopie de fluorescence biomédicale

par **Léon ESPINOSA**

Docteur ès sciences

Ingénieur de recherche CNRS

Responsable du service de microscopie et de criblage du LCB (Laboratoire de Chimie Bactérienne) UMR CNRS 7283 Aix Marseille Université

et **Yves TOURNEUR**

Ingénieur École Centrale de Lyon

Docteur ès sciences, chargé de recherche CNRS, laboratoire INSERM U1060

Responsable de la plateforme Centre de quantimétrie, Université Claude Bernard Lyon 1

1. Préparations fluorescentes	BIO 7 200 - 2
1.1 Principe physique de la fluorescence moléculaire.....	— 2
1.2 Dissipation par FRET	— 3
1.3 FRAP.....	— 4
1.4 Molécules fluorescentes utilisés en microscopie.....	— 4
1.5 Marquage des cibles biologiques.....	— 5
2. Dispositifs optiques	— 10
2.1 Microscope plein-champ.....	— 10
2.2 Réponse impulsionnelle en microscopie de fluorescence.....	— 12
2.3 Sources d'éclairage pour la microscopie de fluorescence.....	— 13
3. Techniques d'observation d'objets épais	— 14
3.1 Obstacles à l'observation directe	— 14
3.2 Microscopie à feuille de lumière	— 14
4. Techniques de microscopie avancées	— 15
4.1 Restriction de la zone explorée.....	— 15
4.2 Techniques de super-résolution	— 18
5. Capteurs d'image	— 22
5.1 Détecteurs matriciels	— 22
5.2 Détecteurs linéaires	— 23
5.3 Capteurs ponctuels	— 23
5.4 Capteurs résolus en temps	— 24
6. Acteurs industriels de la microscopie à fluorescence	— 24
6.1 Structure du secteur	— 24
6.2 Constructeurs de microscopes	— 25
6.3 Caméras.....	— 25
6.4 Périphériques	— 25
6.5 Logiciels.....	— 25
7. Conclusion	— 25
8. Glossaire – Définitions	— 26
Pour en savoir plus	Doc. BIO 7 200

Cet article décrit les principales techniques de la microscopie de fluorescence, les dispositifs commerciaux existants, et les technologies en développement. Le principal domaine d'utilisation de la microscopie de fluorescence est le domaine biomédical dans les applications de recherche

fondamentale, appliquée, de diagnostic, de contrôle de qualité, etc. D'autres applications, en particulier en chimie et sciences des matériaux, utilisent les mêmes principes décrits ici du point de vue des applications des sciences de la vie. Actuellement, la microscopie de fluorescence permet d'étudier au niveau cellulaire et moléculaire les structures biologiques, leur fonctionnement et leurs interactions (division cellulaire, motilité, transport, sécrétion, communication neuronale, etc.).

La microscopie de fluorescence explore les domaines depuis l'ordre du nanomètre, avec les nouvelles techniques de super-résolution, jusqu'aux tailles millimétriques et, dans le domaine spectral, de l'ultraviolet (350 nm) au proche infrarouge (1 µm). Avec les capteurs courants, les temps d'enregistrement vont de la milliseconde à quelques secondes.

D'un point de vue industriel, le développement du secteur dépend d'une interaction dynamique entre les laboratoires de recherche fondamentale (utilisateurs), les laboratoires académiques de recherche en instrumentation, et les constructeurs. La microscopie de fluorescence se situe au carrefour de plusieurs techniques en évolution rapide. Des évolutions apparaissent dans les domaines de la chimie des sondes, des sources de lumière, des lasers, des dispositifs optomécaniques, des détecteurs de lumière, du traitement de signal et des possibilités de l'informatique. Des développements locaux peuvent se retrouver en un ou deux ans sous la forme d'un nouveau produit commercial. L'interaction avec tous ces domaines permet à la microscopie de fluorescence de s'étendre à de nouveaux champs, depuis l'étude moléculaire jusqu'à l'animal vivant. Nous avons choisi l'approche pluridisciplinaire dans la présentation de cet article.

Cette technique est assez universelle, généralement rapide à mettre en œuvre. Un de ses intérêts majeurs est l'extrême spécificité offerte par l'immuno-fluorescence et les protéines de fusion. Elle trouve ses limites dans la difficulté de disposer d'une sonde spécifique et d'explorer des objets épais (> 0,5 mm).

Elle s'applique maintenant en routine dans le domaine du diagnostic médical, de la recherche biomédicale et pharmaceutique, en chirurgie, et dans la recherche en instrumentation.

1. Préparations fluorescentes

1.1 Principe physique de la fluorescence moléculaire

L'interaction de la lumière avec une molécule fluorescente se fait par absorption d'un photon qui cède son énergie à un électron périphérique. Cet électron restitue une partie de l'énergie acquise sous forme de radiation lumineuse. Ce sont les phénomènes de fluorescence et phosphorescence bien connus et décrits dans la littérature ([P 2 835] et [P 2 655]).

La prédiction des longueurs d'onde capables d'exciter une molécule fluorescente et des longueurs d'onde d'émission des photons par désexcitation se fait grâce aux diagrammes de Jablonski qui résument les transitions énergétiques dans la molécule (figure 1).

Le panneau supérieur de la figure représente les niveaux énergétiques de la molécule (traits horizontaux) et les différentes flèches montrent les transitions électroniques possibles (radiatives, non radiatives, conversion interne, croisement inter système). Le panneau inférieur indique la correspondance des pics des spectres d'absorption et d'émission avec les transitions électroniques possibles.

En première approximation, l'énergie électronique (E_e) de la molécule peut être modélisée par l'équation :

$$E_{\text{Totale}} = E_e + E_v + E_r$$

où E_v est l'énergie vibrationnelle et E_r l'énergie rotationnelle.

Les distances inter-atomiques des noyaux de la molécule et leur état vibrationnel d'énergie E_v et rotationnel d'énergie E_r permettent de dissiper une partie de l'énergie gagnée par absorption d'un photon d'énergie égale à :

$$h\nu_a = hc/\lambda_a$$

où h est la constante de Planck, c la vitesse de la lumière, ν_a la fréquence de l'onde lumineuse.

La transition d'une molécule vers un état excité singulet se fait sans changement de la conformation (loi de Franck – Codon, durée de transition $\approx 10^{-15}$ s), or la conformation à l'état fondamental correspond rarement à la conformation la plus stable de l'état excité. L'absorption du photon est suivie par des étapes de désexcitation non radiatives (termes E_r et E_v de l'énergie totale de la molécule). De même les états singulets S_1 et S_2 des molécules fluorescentes sont suffisamment proches énergétiquement pour avoir un passage de S_2 vers S_1 par conversion interne (10^{-11} à 10^{-9} s). Finalement l'énergie électronique disponible pour la dissipation radiative

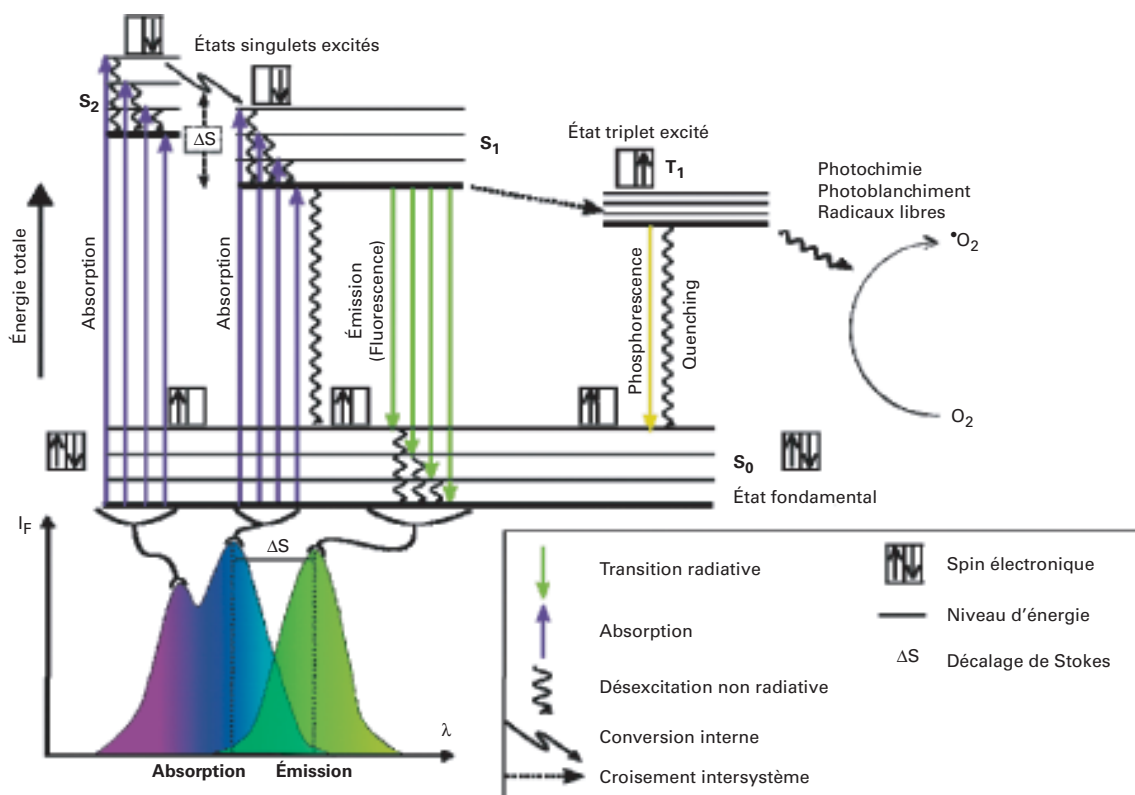


Figure 1 – Diagramme de Jablonski du principe de fluorescence

sous forme d'émission d'un photon de fluorescence (durée de vie 10^{-10} à 10^{-7} s) sera égale à l'énergie du photon absorbée moins l'énergie dissipée par toutes les transitions non radiatives.

Ce photon aura une énergie :

$$h\nu_e = hc/\lambda_e$$

avec $\nu_e < \nu_a$ et $\lambda_e > \lambda_a$.

Ce décalage entre les longueurs d'onde d'absorption et d'émission des molécules fluorescentes est appelé **décalage de Stokes** (ΔS). Les spectres d'excitation et d'émission de la molécule sont les histogrammes de toutes les transitions radiatives possibles entre les états fondamentaux et les niveaux excités. La structure particulière de chaque molécule, ses interactions avec le milieu (protonation, état redox, force ionique, etc.) déterminent la répartition de ces transitions ainsi que leurs cinétiques (temps de vie de la fluorescence). La dissipation de l'énergie d'un état singulet par émission de photon (fluorescence) est en concurrence avec deux autres mécanismes de dissipation : d'une part, une relaxation non radiative par conversion en énergie cinétique (E_v , E_r), d'autre part, une conversion interne vers un état triplet excité (durée de vie 10^{-10} à 10^{-8} s). Cette transition est possible sous certaines conditions, en particulier s'il y a recouvrement des niveaux d'énergie des deux états (S_1 et T_1). L'état triplet excité peut à son tour subir une relaxation radiative vers l'état singulet fondamental (phosphorescence, 10^{-6} à 1 s), ou une relaxation non radiative. La durée de

vie de la molécule à l'état triplet excité est de plusieurs ordres de grandeur plus longue que toutes les autres transitions. Cela augmente la probabilité de collision avec d'autres molécules en solution suffisamment pour dissiper l'énergie de la molécule fluorescente dans des réactions inter moléculaires. Il peut s'agir du transfert à une autre molécule par contact (*Quenching*), ou, en présence d'oxygène, de l'activation vers la forme singulet (O_2^1) très réactive [1].

1.2 Dissipation par FRET

Le **transfert de fluorescence de Förster** (*Förster Resonance Energy Transfer* ou FRET) est un transfert d'énergie non radiatif (sans émission de photons) des électrons excités d'une molécule fluorescente (fluorophore donneur) vers une molécule fluorescente initialement à l'état fondamental (fluorophore accepteur) dont les électrons périphériques passent dans un état excité par transfert d'énergie du donneur et reviennent à l'état fondamental par émission de photons de fluorescence [2]. Dans ce cas particulier, l'excitation de l'ensemble donneur-accepteur se fait à la longueur d'onde d'excitation du donneur et l'émission de fluorescence se fait à la longueur d'onde d'émission de l'accepteur. Les conditions de conformation et de recouvrement des spectres des molécules couplées (donneur-accepteur) sont strictes pour permettre le transfert. La figure 7 illustre une application du FRET.

L'efficacité du transfert E est calculée par les équations suivantes :

$$E = \frac{1}{1 + \left(\frac{r}{R_0}\right)^6} \quad (1)$$

$$R_0 = \left(\frac{9Q \ln(10) \kappa^2 J}{128\pi^2 N} \right)^{1/6} \quad (2)$$

$$J = \int F_D(\lambda) \varepsilon_A(\lambda) \lambda^4 d\lambda \quad (3)$$

avec r rayon donneur-accepteur,
 R_0 rayon de Förster,
 Q rendement quantique du donneur en absence de l'accepteur,
 κ facteur d'orientation des deux molécules,
 J facteur de recouvrement du spectre d'émission du donneur et du spectre d'absorption de l'accepteur [équation (3)],
 n indice de réfraction du milieu,
 N_A nombre d'Avogadro,
 $F_D(\lambda)$ spectre normalisé du donneur,
 $\varepsilon_A(\lambda)$ coefficient d'extinction molaire de l'accepteur.

La relation en inverse de la puissance 6 du rayon [équation (1)] permet de tester le contact effectif entre les deux partenaires (r de l'ordre de quelques nanomètres), car même une colocalisation très proche mais sans contact ne permet pas d'obtenir un signal FRET. Un signal FRET positif est considéré en biologie cellulaire comme la preuve d'une interaction fonctionnelle entre deux molécules. Cependant, une orientation défavorable entre les partenaires [équation (2)] peut empêcher complètement le phénomène.

Une difficulté majeure est la séparation du signal FRET de la fluorescence émise par l'accepteur par excitation directe. La quantification en termes de concentration absolue des protéines en interaction par la technique FRET est également très délicate, en effet l'intensité du signal FRET dépend des concentrations du donneur, de l'accepteur et du complexe donneur-accepteur. La quantification de la concentration des partenaires en interaction par la quantification de l'intensité de fluorescence d'émission de l'accepteur peut être faussée par une variation des concentrations relatives du donneur et de l'accepteur.

Pour éviter cet inconvénient, il est possible de quantifier la concentration des partenaires en interaction FRET par la quantification de la **durée de vie de fluorescence** de l'accepteur (« *Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy* » ou FLIM, dont les technologies ne sont pas traitées dans cet article). En effet, le phénomène de FRET dépend du passage de la molécule fluorescente excitée à l'état triplet. Nous avons vu que la durée de l'état triplet excité peut être 10^3 à 10^6 fois plus longue que la fluorescence. Donc l'augmentation de la durée de vie de fluorescence de l'accepteur sera directement proportionnelle à la concentration du complexe donneur-accepteur en interaction FRET.

1.3 FRAP

Les réactions photochimiques provoquées par le passage à l'état triplet produisent un « blanchiment » des molécules fluorescentes. Leurs modifications conduisent à des nouvelles espèces chimiques qui ont perdu les propriétés fluorescentes. Ce phénomène est exploité dans différentes techniques d'exploration fonctionnelle des cellules, en particulier la FRAP ou « *Fluorescence Recovering After Photo-bleaching* ».

Une région donnée de la cellule est éclairée intensément pendant un temps bref par rapport à la dynamique de renouvellement

des molécules fluorescentes. Le renouvellement peut être dû à la diffusion de molécules fluorescentes en provenance des régions voisines ou à une néo-synthèse par la machinerie cellulaire. L'étude de la récupération de la fluorescence dans la région « blanchie » renseigne l'expérimentateur sur les propriétés de diffusion des molécules fluorescentes dans la zone explorée. À partir de cette technique d'autres variantes ont été développées comme le FLIP ou « *Fluorescence Loss In Photo-bleaching* ».

1.4 Molécules fluorescentes utilisées en microscopie

Les molécules fluorescentes sont caractérisées par leurs pics d'absorption et d'émission, par le décalage de Stokes (figure 1), le rendement quantique qui est le ratio des photons émis par photon absorbé, et par un coefficient qui mesure la capacité d'absorption de photons par molécule. En microscopie de fluorescence, on va tirer avantage des propriétés de différentes molécules pour visualiser plusieurs structures biologiques simultanément, c'est le **marquage « multicolore »**. Pour séparer au mieux la fluorescence de chaque molécule, un décalage de Stokes important et des spectres étroits d'excitation et d'émission sont recherchés. D'autres qualités sont demandées : forte brillance (rendement quantique multiplié par le coefficient d'absorption), stabilité, spécificité, faibles modifications de la structure cible (en particulier d'un point de vue fonctionnel) et faible chimio-toxicité et photo-toxicité.

1.4.1 Molécules organiques

Les molécules fluorescentes utilisées en microscopie sont appelées **fluorophores**. Leur structure chimique présente certains points communs : ce sont des molécules rigides planes, polycycliques, polyaromatiques, avec des liaisons conjuguées (voir des exemples dans la figure 2 : FITC, DAPI). Nombreux composés ont été dérivés de fluorescéine (n° Chemical Abstract Service (CAS) 2321-07-5), de la rhodamine (CAS 81-88-9), et de leurs dérivés isothiocyanate FITC et TRITC, ainsi que de la coumarine (CAS 91-64-5) et des cyanines. Nous décrirons en détail les marqueurs fluorescents pour la biologie ainsi que des molécules organiques fluorescentes particulières qui sont les protéines fluorescentes.

1.4.2 Nanocristaux fluorescents

Des nanocristaux semi-conducteurs de 2 à 20 nm appelés *Quantum Dots* ont des propriétés fluorescentes intéressantes : le spectre d'excitation est très large, de l'ultraviolet au bleu, et leur spectre d'émission est étroit (≈ 30 nm). Pour chaque espèce, le pic d'émission est déterminé par leur diamètre (les plus gros fluorescents du côté du rouge), et couvre tout le domaine visible et le proche infrarouge. Ils sont extrêmement brillants et très résistants au photo-blanchiment. Ils ont donc été préparés de façon à pouvoir être utilisés comme marqueurs des structures biologiques. Pour cela, il faut ajouter des fonctions chimiques à leur surface permettant de les conjuguer avec les molécules de détection (anticorps par exemple) des cibles biologiques considérées. Ce sont des outils de choix pour le suivi de molécule unique.

Absorbant les électrons, ils sont également utiles comme sonde pour les observations couplées en microscopie optique et électrochimique. Ils présentent l'inconvénient de clignoter pendant l'excitation, d'avoir une propension à former des agrégats et une forte toxicité cellulaire, ce qui implique un enrobage neutre.

D'autres nanoparticules sont utilisées. Les particules d'or et les nanodiamants ne présentent pas les mêmes inconvénients de toxicité, en particulier pour des expériences de longue durée [3]. Les particules de fer ne sont pas fluorescentes, mais peuvent être couplées à une molécule fluorescente pour associer l'imagerie de résonance magnétique et la microscopie.

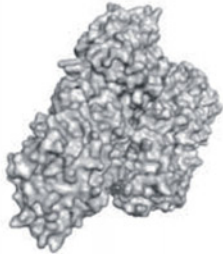
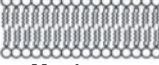
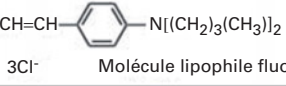



Cibles biologiques	Ingénierie moléculaire	Sondes fluorescentes	Complexe fluorescent
 Protéines	GFP Protéines de fusion fluorescentes		
	Cys Cys Pro Gly Cys Cys Modifications orthogonales	Bi-arsénates (FLAsH)	
	F-Actine Produits naturels spécifiques (Phalloïdine-FITC)	FITC	
	Anticorps primaire fluorescent		
	Anticorps primaire non fluorescent	Anticorps secondaire fluorescent	
 Membranes	$\text{H}_3\text{N}^+(\text{CH}_2)_3\text{N}^+(\text{CH}_2)_3\text{CH}_3$ CH_2 CH_3	 Molécule lipophile fluorescente (FM ® 1-43)	
 Sucres	Lectines-FITC	Concavalline A	
 ADN	DAPI		
 Ions	Fluo-3		Ca^{2+} Ca Complex

Figure 2 – Classification des molécules biologiques et des stratégies de marquage. Pour chacune des familles des molécules biologiques, un exemple de sonde fluorescente est illustré ainsi que le complexe fluorescent produit

1.5 Marquage des cibles biologiques

L'enjeu de l'utilisation de la fluorescence moléculaire pour les observations microscopiques, en particulier dans le domaine des sciences du vivant, est d'obtenir un marquage d'une structure d'intérêt. Des contraintes plus spécifiques à chaque cible biologique se rajoutent, la plus importante étant le moyen d'apporter les fluorophores jusqu'à leur cible et de les lier à celle-ci de façon spécifique.

La classification que nous proposons dans la figure 2 est basée sur les stratégies de marquage des différentes structures biologiques plutôt que sur les structures chimiques car cela correspond plus exactement à la démarche nécessaire aux expérimentateurs en microscopie de fluorescence. Le marquage de chaque famille des molécules biologiques est repris en détail dans les paragraphes suivants.

Des nombreuses entreprises de fabrication de réactifs pour la biologie proposent dans leur catalogue toutes les catégories de fluorophores décrits ici ainsi que des kits permettant de coupler les molécules fluorescentes à toute sorte de cibles biologiques et chimiques : Life Technologies, Sigma-Aldrich, Biotium, etc.

1.5.1 Marquage direct

Nombreux composés issus des produits naturels ou de la chimie de synthèse ont la propriété de se lier de façon stable (liaison non covalente) et très spécifique à plusieurs familles de structures biologiques. Ces molécules sont directement fluorescentes ou rendues fluorescentes par modification chimique qui va leur greffer un groupe d'atomes fluorescents.

Dans le cas du marquage direct, une seule molécule assure les fonctions de détection spécifique d'une structure et de marquage fluorescent. Les structures cibles du marquage direct sont en général des macromolécules ou des supra-structures formées par répétition d'une molécule de base, qui présentent donc une forte homogénéité chimique. Cette homogénéité est exploitée pour construire des sondes de même nature (molécules hydrophobes pour les lipides, bases azotées cycliques pour les acides nucléiques, etc.).

■ Membranes lipidiques

Les membranes cellulaires sont des structures formées par une double couche de molécules lipidiques avec un pôle hydrophile et une chaîne aliphatique. Les membranes peuvent être marquées par des molécules hydrophobes ou amphiphiles.

Les membranes cellulaires étant directement accessibles, le marquage se fait par simple mise en contact, par exemple : FM 1-43[®] Life Technologies, Dil, TMA-DPH (1-(4-Triméthylammonium-phenyl)-6-Phenyl-1,3,5-Hexatriène p-Toluenesulfonate). Les difficultés sont dues à la mise en solution des molécules hydrophobes et à la perte de spécificité par diffusion du marquage dans les autres membranes de la cellule.

■ Chaînes glucidiques (polymères de sucres hexoses)

Les chaînes glucidiques présentent une immense diversité de structures, chaque maillon pouvant être un des très nombreux sucres de la biochimie cellulaire. Il existe une famille de protéines d'origine végétale, les lectines, qui ont une très grande affinité et spécificité pour un certain type de sucre de la chaîne ou pour des combinaisons de sucres. Ces lectines couplées avec un fluorophore sont utilisées en marquage direct des structures glucidiques (Concavalline A, WGA, UEA, etc.).

■ Acides nucléiques (ADN, ARN)

Les acides nucléiques sont des macromolécules polymériques formées par une répétition de bases azotées polycycliques reliées par un pentose et un acide phosphorique. Les monomères de la structure sont appelés nucléotides : Adénine, Guanine, Thiamine, Cytosine, Uracile. Les acides nucléiques sont marqués par des molécules polycycliques aromatiques analogues des bases azotées des nucléotides. Ces molécules de petite taille peuvent s'insérer entre les bases (exemple : Bromure d'éthidium) ou se lier au niveau du sillon de la double hélice de l'ADN (DAPI, Hoechst 33342, SYBR Green[®] Life Technologies, DRAQ5[™] TO-PRO-3[®]). Ces molécules traversent bien les membranes lipidiques, ce qui permet que le marquage se fasse par application directe de la sonde sur les cellules à marquer. Leur toxicité limite leur utilisation avec du matériel vivant.

Une autre approche de marquage sélectif de certaines régions des acides nucléiques utilise l'information codée par la séquence des nucléotides. Sous forme monocaténaire, une chaîne nucléotidique a une grande affinité pour une chaîne complémentaire d'après les règles d'appariement G/C A/T. Un ou plusieurs fluorophores peuvent ainsi être couplés à une sonde constituée par l'oligonucléotide de séquence complémentaire de la séquence cible. Un protocole permet de favoriser la liaison de la sonde avec sa cible (par exemple : ouverture de la double chaîne d'ADN, chauffage, bains de formamide, etc.). Cette technique est à la base du FISH (*Fluorescence In Situ Hybridization*) utilisée dans certains tests de diagnostic des maladies génétiques.

■ Protéines polymériques

Certaines protéines constituées de répétitions d'un monomère peuvent être reconnues de façon spécifique par une molécule d'origine naturelle. C'est le cas des protéines du cytosquelette comme l'actine et la tubuline. L'actine sous sa forme filamenteuse F-actine est reconnue par une protéine extraite de l'amanite phal-

loïde, la phalloïdine. Elle est utilisée conjuguée de façon covalente avec un résidu fluorescent comme le FITC. La tubuline peut être marquée par le paclitaxel (ou taxol, dérivé de l'if) rendu fluorescent (Tubulin Tracker[®] Life Technologies).

■ Espèces ioniques

La fluorescence peut être utilisée pour suivre l'évolution ou même mesurer des concentrations ioniques intracellulaires. C'est le cas des ions Ca^{2+} , Mg^{2+} , Zn^{2+} , Na^+ , K^+ , Cl^- , du pH et du potentiel redox.

La quantification des espèces ioniques par l'intensité de fluorescence est basée sur l'hypothèse d'une proportionnalité entre la concentration de l'ion et l'intensité de fluorescence du fluorophore. La figure 3 montre trois méthodes de quantification du calcium libre. Le Fluo-3 présente une intensité d'émission au pic du spectre proportionnelle à la concentration de calcium dans le milieu. Cette méthode a plusieurs inconvénients : une dépendance aux variations du marqueur dues par exemple au photo-blanchiment, à l'épaisseur de l'échantillon, au compartiment cellulaire étudié, etc. On considère que ce type de sonde permet uniquement une quantification relative des variations calciques, mais pas de quantification absolue avec une courbe étalon. Pour s'affranchir de ces limites, on privilégie une méthode ratiométrique et dans ce cas, il est nécessaire de faire une mesure à deux longueurs d'onde : une mesure qui varie avec la concentration calcique et une mesure de référence. En faisant le ratio entre les deux mesures, on obtient les variations uniquement dues à la concentration du calcium. La mesure de référence se fait au point isobestique pour lequel l'efficacité d'absorption ou d'émission ne dépend pas de la concentration calcique (concrètement le point de croisement de tous les spectres d'une courbe étalon). La figure 3 montre deux exemples de sondes ratiométriques. L'indo-1 excité à 338 nm présente un pic d'émission à 405 nm qui varie proportionnellement avec le calcium et un point isobestique à 485 nm. Le Fura-2 présente un pic d'absorption dans son spectre d'excitation à 340 nm qui augmente avec la concentration calcique, et un point isobestique à 380 nm. Pour cette sonde, il faut donc disposer d'un moyen de faire rapidement la mesure au maximum de l'émission (510 nm) aux deux longueurs d'onde d'excitation (on utilise en général un monochromateur rapide ou une roue à filtres).

Il existe aujourd'hui dans les catalogues commerciaux un large choix de marqueurs fluorescents prêts à l'emploi pour toutes les cibles décrites précédemment.

Des marqueurs fluorescents peuvent aussi mesurer de façon indirecte une différence de potentiel électrique en se répartissant à travers la membrane selon la **relation de Nernst** (mitochondries : TMRE, TMRM). L'affinité de certaines molécules fluorescentes pour les compartiments acides ou basiques peut être également exploitée pour obtenir des **marqueurs d'organites intracellulaires** (lysosomes).

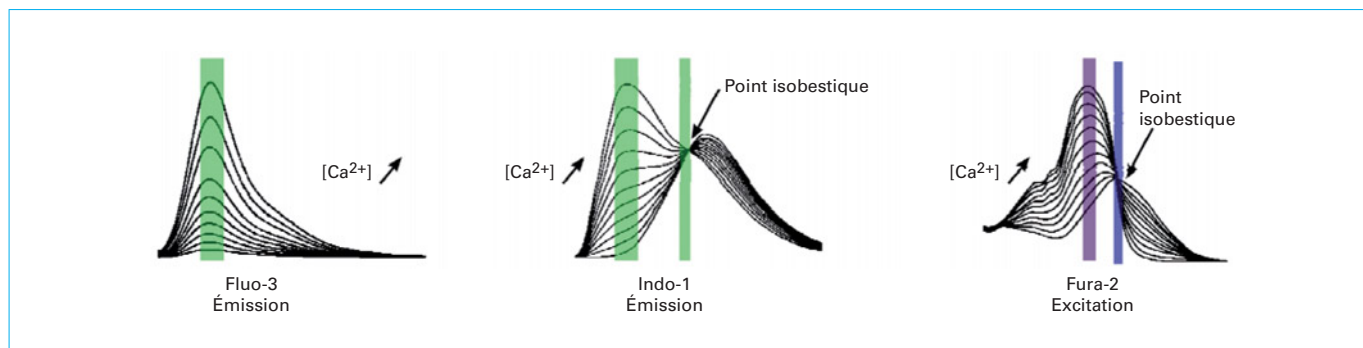


Figure 3 – Spectres d'émission ou d'excitation des principales familles des sondes calciques fluorescentes

1.5.2 Marquage des protéines par immunofluorescence

Les protéines sont des macromolécules biologiques qui se distinguent par l'extrême diversité de leurs formes, de leurs tailles et de leurs affinités, elles peuvent être solubles, membranaires, neutres, polaires, chargées, etc. Le marquage fluorescent spécifique par affinité d'une protéine en particulier n'est possible en pratique que par l'utilisation d'autres protéines capables de reconnaître cette diversité (**Immunofluorescence**).

Les anticorps sont des protéines spécifiques du système immunitaire des organismes supérieurs. Le principe général est de déclencher une réaction immunitaire dans un organisme hôte (lapin, rat, chèvre, etc.) en réaction à l'injection dans cet organisme de la protéine cible provenant d'une autre espèce (souris, homme).

Il existe des nombreuses variantes de ce schéma de base. En particulier les anticorps peuvent être polyclonaux ou monoclonaux. Les **anticorps polyclonaux** sont des anticorps reconnaissant tous le même antigène (protéine cible) mais différents entre eux car produits par toute une population hétérogène de lymphocytes B. Les **anticorps monoclonaux** sont tous identiques entre eux car produits par un clone de cellules issues d'un seul lymphocyte B. Au niveau de la technique de marquage, deux stratégies sont possibles (figure 4).

■ Marquage immunofluorescent direct

Une fois les anticorps produits et purifiés, ils peuvent être combinés chimiquement par liaisons covalentes avec des résidus fluorescents comme le FITC. On parle d'**anticorps primaires fluorescents**.

rescents. Ils sont utilisés ensuite comme une sonde fluorescente classique qui va marquer la protéine cible. Leur utilisation peut être difficile car il faut rendre accessible les cibles par des procédures de perméabilisation des cellules, et une fixation chimique est également nécessaire pour conserver les protéines ciblées. La spécificité du marquage dépend de toutes les étapes de purification, elle peut être assez faible avec les anticorps polyclonaux.

■ Marquage immunofluorescent indirect

C'est la technique la plus utilisée. Dans ce cas, il n'y a pas d'ajout d'un résidu fluorescent sur l'anticorps. Cet anticorps, dit primaire, est reconnu par un deuxième anticorps, dit secondaire, dirigé spécifiquement contre la partie commune de tous les anticorps d'une espèce (l'espèce hôte qui a servi à produire l'anticorps primaire).

Cette méthode a plusieurs avantages. Il n'est pas nécessaire de faire des conjugaisons chimiques pour chaque nouvelle protéine cible. L'anticorps secondaire fluorescent sert pour tous les anticorps primaires. Il y a une multiplication du signal ; en effet, dans le cas du marquage direct, un site de reconnaissance est marqué avec un seul anticorps primaire fluorescent, dans le marquage indirect l'anticorps primaire est reconnu et fixe plusieurs anticorps secondaires fluorescents.

Les techniques d'immunofluorescence sont utilisées couramment pour toutes les tâches d'identification d'expression d'une protéine spécifique (diagnostic biologique par sérologie, recherche en cytologie et histologie). Il est cependant rare que l'on puisse utiliser cette technique avec des cellules vivantes à cause des étapes de perméabilisation et de fixation.

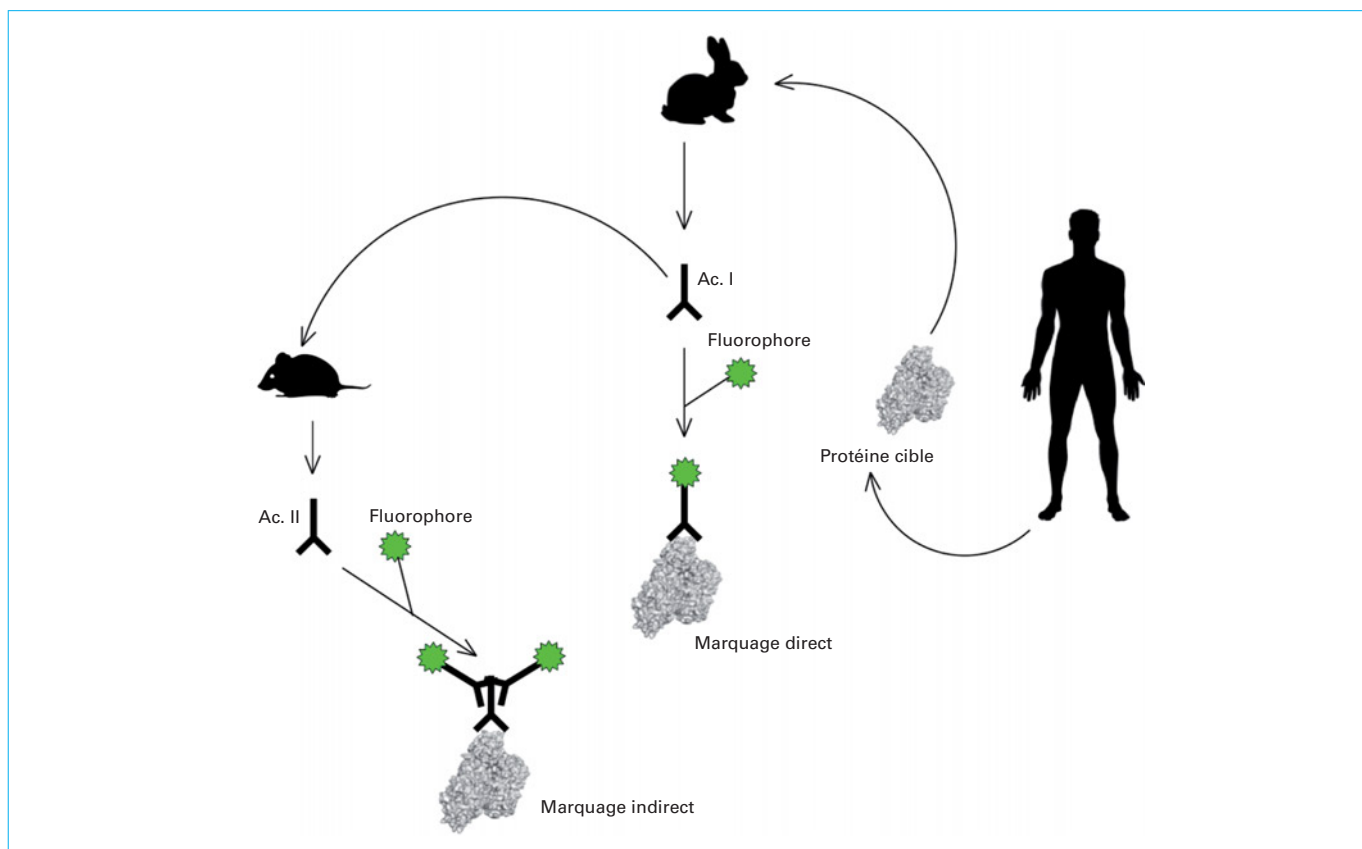


Figure 4 – Techniques de marquage en immunofluorescence. Le principe est d'injecter une protéine que l'on veut détecter dans un animal (lapin, souris) pour lui faire produire des anticorps

1.5.3 Étiquetage par les protéines de fusion fluorescentes

Une autre approche est la transformation de la protéine native « cible » en une protéine fluorescente directement observable. Cette transformation peut se faire par les techniques de biologie moléculaire [4].

1.5.3.1 Principe de la fusion

Les protéines de fusion exploitent la fluorescence naturelle des certains organismes marins, en particulier des méduses (*Aequorea victoria*). La principale protéine de cette famille est la « *Green Fluorescent Protein* » (GFP). Il s'agit d'une protéine composée de onze feuillets beta en forme de tonneau et d'une hélice alpha. Le chromophore responsable de la fluorescence se forme de façon spontanée par réaction entre les acides aminés Serine-65, Tyrosine-66 et Glycine-67. L'expression de la GFP est dépendante d'une bonne oxygénation des cellules [5].

La séquence de la protéine native a été modifiée au cours du temps par les techniques de biologie moléculaire pour en faire aujourd'hui un des outils les plus utilisés en biologie cellulaire. L'identification d'autres protéines fluorescentes naturelles et les modifications moléculaires ont permis d'obtenir des protéines fluorescentes destinées au marquage des protéines pour la microscopie avec d'excellentes caractéristiques : des spectres couvrant tout le domaine de la lumière visible, très brillantes, résistantes au photo-blanchiment, etc.

Le principe de « l'étiquetage » (*labeling*) consiste à fusionner le gène de la protéine cible avec le gène de la protéine fluorescente (figure 5), en général la « *Enhanced Green Fluorescent Protein* » ou EGFP. Cette fusion se fait au moyen d'une molécule d'ADN circulaire (plasmide) qui contient au début le gène de la GFP et d'autres séquences permettant sa manipulation, comme l'ouverture du plasmide par des enzymes et l'expression optimisée des gènes insérés : origine de réplication, promoteurs, promoteurs inductibles, etc. Le plasmide peut donc être ouvert en une molécule linéaire qui peut se lier avec le gène de la protéine cible et se re-circulariser. La molécule d'ADN ainsi produite va coder pour un gène hybride qui, après transcription et traduction, va produire

une protéine cible modifiée avec à une extrémité (c-terminal ou N terminale selon la construction initiale). La quantité du plasmide ainsi obtenue peut être amplifiée par culture bactérienne.

1.5.3.2 Utilisation des protéines de fusion fluorescentes

Les protéines de fusion ont révolutionné la biologie cellulaire. Par construction, la seule protéine fluorescente est la protéine cible. La production endogène par la cellule évite tous les problèmes d'accessibilité des cibles aux sondes fluorescentes (pas de fixation chimique et perméabilisation). Cette approche a rendu possible la vidéo microscopie en fluorescence sur échantillons vivants. Des très nombreux processus cellulaires fondamentaux sont étudiés grâce à cette technique : division cellulaire, motilité, trafic intracellulaire, signalisation, etc.

La possibilité d'utilisation des protéines de fusion dépend de la réussite de trois étapes : la création du plasmide de fusion, l'importation du plasmide dans la cellule cible et l'expression fonctionnelle de la protéine de fusion.

Il existe une grande variété d'outils et de protocoles destinés à faire pénétrer les plasmides dans les bactéries et les cellules eucaryotes.

Selon le type de cellule dans laquelle l'expérimentateur veut étudier la protéine cible, les stratégies d'importation du plasmide sont très différentes.

■ **Les cellules procaryotes.** Certaines bactéries, dites spontanément compétentes, ont la capacité d'importer les plasmides du milieu. Une fois le plasmide contenant le gène de la protéine de fusion importé dans la cellule, il peut être exprimé directement à partir du plasmide, ou intégré dans le chromosome bactérien et puis transcrit et traduit en protéine ;

■ **Les cellules eucaryotes.** Le plasmide ne peut pas être transcrit et traduit de façon autonome dans le cytoplasme, il doit être intégré à l'ADN nucléaire. Une solution alternative et transitoire est d'injecter de l'ARN messager correspondant à la protéine de fusion dans le cytoplasme, les ARN messagers sont progressivement dégradés par la cellule et la production de la protéine de fusion s'arrête.

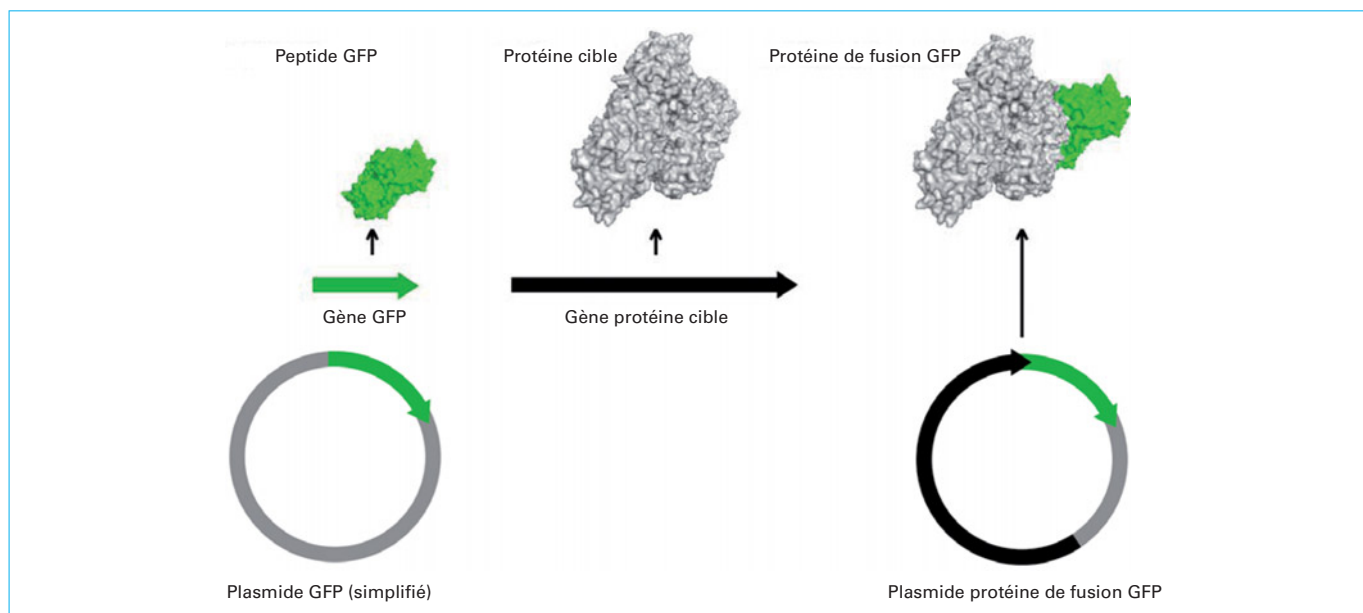


Figure 5 – Technique de protéine recombinante. Fusion des gènes de la protéine cible et d'une protéine fluorescente au sein d'un plasmide

Commercialement, il existe de nombreux outils, aussi bien des plasmides avec les différents gènes de protéines fluorescentes et avec les sites d'insertion nécessaires pour intégrer le gène de la protéine cible, que des lignées cellulaires immortelles exprimant de façon permanente des protéines courantes (éléments du cytosquelette par exemple). Il existe également des animaux de laboratoire (souris, mouches, vers, etc.) qui ont intégré dans leurs chromosomes des protéines de fusion.

Les précautions à prendre pour l'utilisation des protéines de fusion concernent d'une part la modification de la protéine cible, dont le fonctionnement peut être modifié, voire supprimé, par l'ajout de la chaîne fluorescente. La plupart des expériences faites avec les protéines de fusion comportent une partie de contrôle montrant que la fonction de la protéine native est conservée. D'autre part, les protéines fluorescentes peuvent être nocives par leur exposition au rayonnement d'excitation (photo-toxicité qui peut être atténuée par des molécules qui piègent les radicaux libres).

1.5.3.3 Protéines fluorescentes modulables

Plus récemment, les protéines fluorescentes de fusion ont apporté des nouveaux outils pour la compréhension des mécanismes moléculaires. Les protéines fluorescentes modulables permettent de modifier les caractéristiques de la fluorescence en réponse à une action de l'expérimentateur. Cela permet de définir des protocoles expérimentaux complexes.

■ **Protéines photo-activables (PA-GFP, Kaede).** La protéine change de propriétés spectrales après exposition à une excitation lumineuse à 400 nm. L'absorption à 475 nm de la PA-GFP est multipliée par 100. La Kaede déplace sa fluorescence vers le rouge en multipliant le ratio d'émission vert/rouge par 2 000. L'activation de ces protéines est irréversible.

■ **Protéines photo-convertibles.** Exemple de la Dronpa, dérivée de la GFP. Il s'agit d'une protéine qui offre la possibilité d'être activée ou inactivée par excitation lumineuse à deux longueurs d'ondes différentes (figure 6) :

- une exposition de faible intensité à 405 nm modifie la conformation moléculaire et rend la molécule fluorescente : état « on » qui s'excite à 503 nm et émet à 518 nm ;
- une exposition d'une forte intensité à 488 nm modifie la conformation moléculaire et change ses caractéristiques spectrales : état « off » qui s'excite à 380 nm et émet à 518 nm.

Cette propriété permet de faire des cycles « allumé/éteint » commandés par l'expérimentateur en fonction des besoins du protocole. Plus de 100 cycles sont possibles.

■ **Protéines chronomètres « Timer Protein ».** Une mutation d'une protéine de fusion rouge (RFP) (drFP583) permet d'obtenir une protéine dont le spectre d'émission passe du vert au rouge au cours du temps. Le spectre d'émission de la protéine présente un ratio d'environ 10:1 entre le pic à 510 nm et un faible pic à 580 nm. 48 h

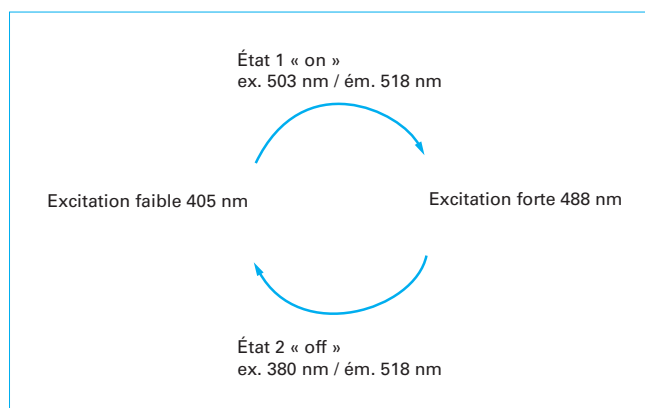


Figure 6 – Cycle des états de la Dronpa, protéine photo-convertible

après la production de la protéine, ce ratio est complètement inversé.

■ **Biosenseurs FRET.** On regroupe sous le terme de biosenseurs, des protéines dont l'intensité de fluorescence est une fonction de la concentration d'une molécule cible (en général une molécule non protéique) dans son environnement.

Le phénomène de FRET a été exploité en s'affranchissant des variations relatives du complexe donneur-accepteur par une construction où les deux protéines fluorescentes sont reliées de façon covalente par une chaîne peptidique (figure 7). Dans cette partie est inséré un domaine de reconnaissance de la molécule cible. La liaison de la cible avec son domaine déclenche le réarrangement du système et rapproche le donneur de l'accepteur avec couplage et émission FRET. Des nombreuses études ont été faites pour doser de façon rapide des molécules biologiques (exemple : sondes caméléon pour le calcium) ou environnementales (pollutions par exemple) grâce au FRET ou à l'expression de protéines fluorescentes couplées à des protéines rapporteur dans des micro-organismes modifiés.

■ **Complémentation « BiFC » (Bimolecular Fluorescence Complementation).** Cette technique est utilisée pour montrer l'interaction entre deux protéines (figure 8). Pour cela, la protéine fluorescente native (GFP, YFP) est scindée en deux peptides indépendants couplés chacun à l'une et l'autre des protéines à tester. Si les protéines interagissent d'une façon stable, alors les deux fragments de la protéine fluorescente se rapprochent suffisamment pour reconstituer la structure tridimensionnelle de la protéine fluorescente, ce qui permet la formation du noyau fluorescent et le phénomène de fluorescence est détecté.

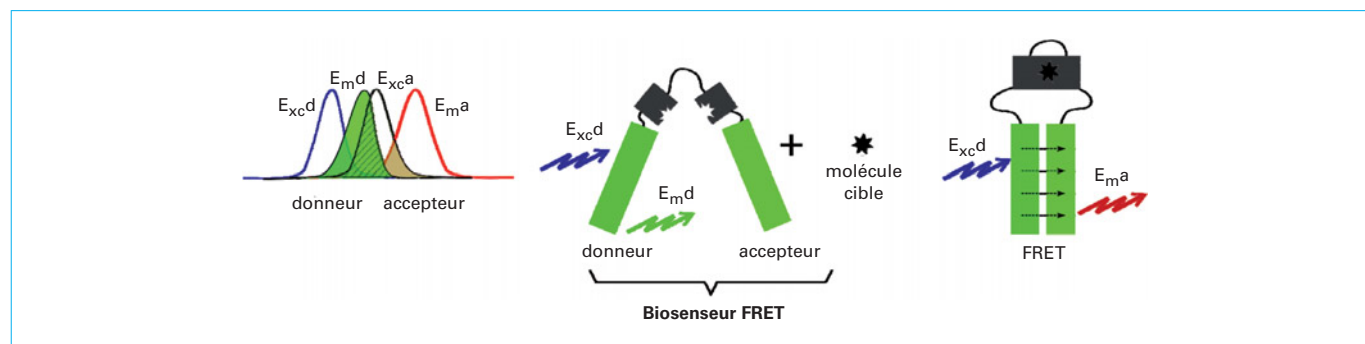


Figure 7 – Principe d'un biosenseur FRET

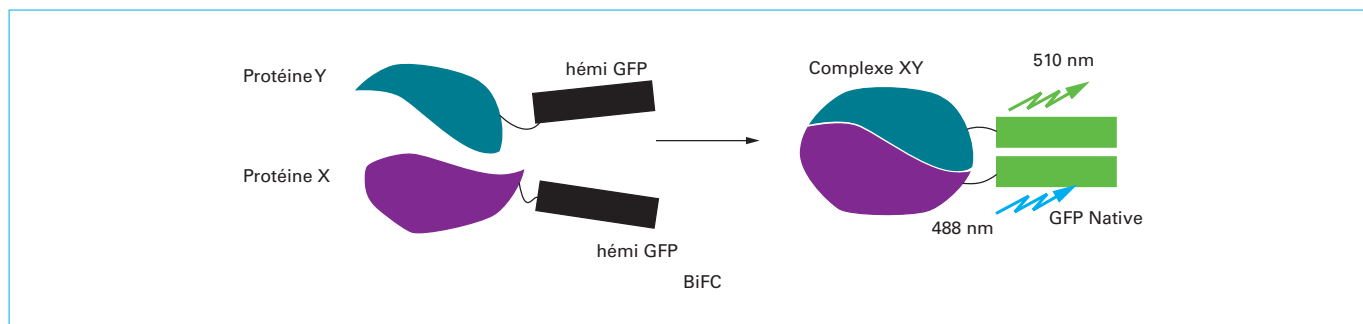


Figure 8 – Principe de détection d'interaction de deux protéines par sonde BiFC

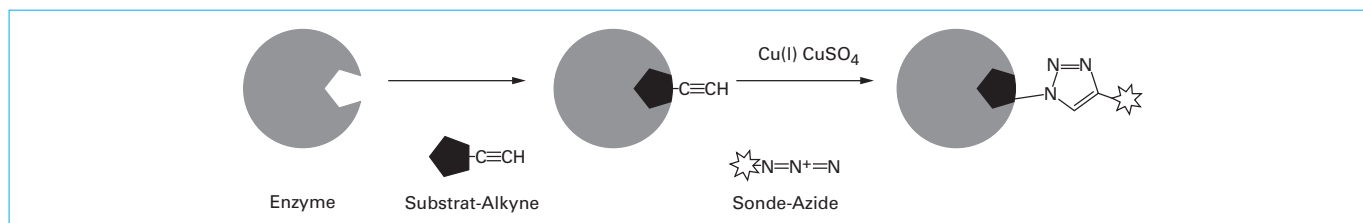


Figure 9 – Principe du marquage d'un enzyme par chimie Click

1.5.4 Étiquetage par modifications orthogonales et chimie Click

Le terme « orthogonal » fait référence à des modifications biochimiques ou moléculaires dans lesquelles un élément qui n'existe pas dans la chimie du vivant est introduit. Ces stratégies de marquage des molécules cibles (principalement des protéines) sont basées sur le principe général de remplacement d'un des partenaires d'une réaction biochimique (ou d'une partie seulement dans le cas d'une protéine) par une molécule comportant un groupe réactionnel permettant de lui greffer ultérieurement une molécule fluorescente de manière absolument spécifique [4].

La **chimie Click** désigne des réactions chimiques qui créent des liaisons covalentes entre deux composés et qui miment les réactions de polymérisations biologiques (chaînes peptidiques, polysidiques). Pour cela, deux réactifs de petite taille (quelques atomes) sont mis en présence d'un catalyseur qui permet la création d'une liaison covalente entre les deux. Cette liaison n'a lieu avec aucun autre type de molécules (en particulier eau et oxygène), et elle ne doit pas avoir lieu en absence de catalyseur, se faire à température ambiante et être stéréospécifique. La plus connue de ces réactions est la cyclo-addition entre un radical alkyne et un radical azide, catalysée par des ions cuivre I.

La figure 9 illustre un marquage fluorescent d'une enzyme grâce à cette réaction. Si on dispose du substrat spécifique de l'enzyme, il est possible de le conjuguer avec un radical alkyne. Par ailleurs, on construit une sonde fluorescente avec un radical azide. Au moment voulu pour révéler la réaction, la sonde-azide est mise en présence du complexe enzyme-substrat-alkyne. On obtient ainsi le marquage spécifique.

Cette technique a aussi été utilisée pour marquer d'autres types de molécules biologiques comme les parois bactériennes [6].

Une multitude d'approches technologiques avec des stratégies similaires ont été développées par des équipes académiques ou des entreprises commerciales : « SNAP-tag », « CLIP-tag », « FLAsH ».

2. Dispositifs optiques

Ce chapitre aborde le principe de la microscopie à épifluorescence ainsi que les dispositifs annexes nécessaires tels que les sources d'excitation, et les solutions techniques aux contraintes liées à l'observation du matériel biologique.

2.1 Microscope plein-champ

La dénomination du microscope à fluorescence comme « microscope plein-champ » ou « *widefield* » en anglais s'est imposée aujourd'hui pour le différencier des microscopes confocaux qui se sont répandus depuis les années 1990.

Le microscope à fluorescence est basé sur le microscope classique en lumière visible (les principes optiques sont décrits dans [R 6 712]). Il est doté depuis les années 1980 d'une optique à l'infini [R 6 710] et [R 6 712]. La figure 10 décrit le principe de l'épiscopie utilisé en microscopie de fluorescence.

2.1.1 Éclairage et séparation des faisceaux en épiscopie

L'objet est éclairé à travers l'objectif de la même façon qu'une observation en réflexion. En montage épiscopique, l'objectif sert à la fois à l'éclairage (« excitation ») de l'objet et à l'observation de l'émission de fluorescence (« émission »). Par construction, la source de lumière d'excitation est montée de façon à obtenir un **éclairage dit de Köhler** (figure 10a). Le plan de focalisation de la lumière d'excitation est sur le plan focal arrière de l'objectif. Cela permet d'avoir un éclairage intense et uniforme. Les éléments du dispositif étant fixes, cela ne nécessite pas de réglages fréquents.

La séparation des faisceaux lumineux d'excitation et d'émission s'effectue par un miroir dichroïque qui se comporte comme un miroir ou comme une lame transparente selon la longueur d'onde. Le miroir dichroïque et les filtres d'excitation et d'émission sont des interféromètres réalisés à partir d'un empilement de couches multidiélectriques ou **interféromètres Fabry-Pérot**, ils laissent passer certaines longueurs d'onde et réfléchissent les autres. Les

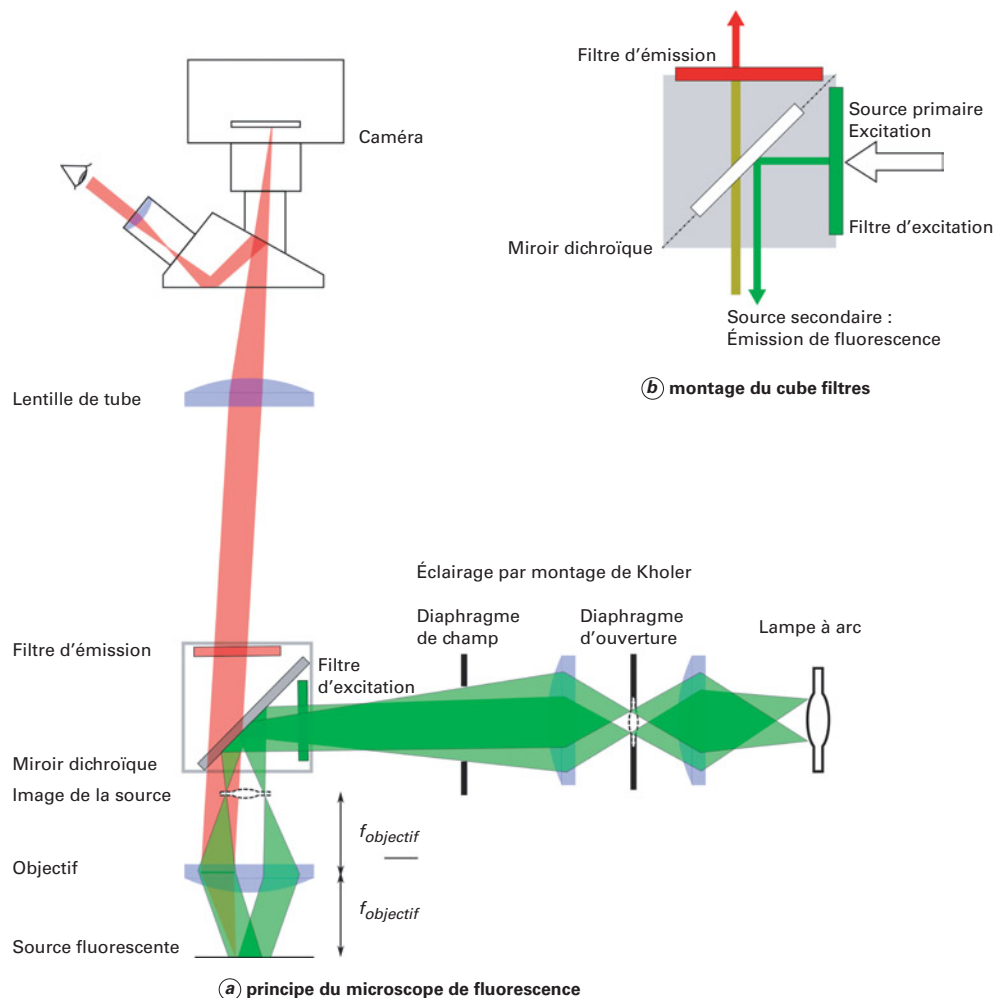


Figure 10 – (a) Principe de montage d'un microscope de fluorescence, (b) détail de la séparation des faisceaux par un cube dichroïque

caractéristiques sont données par les fabricants. Les trois éléments sont assemblés dans un cube rigide qui est nommé d'après la molécule pour laquelle il est adapté, par exemple Dapi, FITC, Rhodamine, etc. Le principe du montage est décrit dans la figure 10b. Les microscopes à épifluorescence sont habituellement équipés d'une tourelle permettant de disposer de quatre à huit cubes.

La source d'excitation est placée perpendiculairement à l'axe du microscope, son spectre contient les différentes longueurs d'onde d'intérêt. Le filtre d'excitation laisse passer seulement les longueurs d'ondes correspondant au spectre d'excitation de la molécule considérée. La lumière d'excitation filtrée est réfléchiée vers l'échantillon par le miroir dichroïque à 45°. La lumière émise par fluorescence traverse l'objectif et, du fait du décalage de Stokes, traverse le miroir dichroïque. Le filtre d'émission permet de restreindre la lumière recueillie aux longueurs d'onde souhaitées et contribue à éliminer les réflexions parasites de l'excitation. Lors d'un marquage multicolore, les images correspondant à chaque fluorophore s'effectuent séquentiellement en changeant le filtre dans le chemin optique. Une position doit rester vide en général pour permettre l'utilisation classique en diascopie.

Les blocs dichroïques

Les constructeurs nomment souvent les ensembles d'après les fluorophores auxquels ils sont destinés : DAPI (bleu), FITC (vert), TRITC (rouge).

Les filtres et miroirs **multibandes** utilisés en microscopie sont des composants dichroïques possédant deux ou trois bandes spectrales de transmission séparées par des intervalles. Ils nécessitent l'utilisation d'une caméra couleur. Ils sont nommés d'après les fluorophores observés simultanément exemple : « DAPI-FITC-TRITC ».

Des solutions plus performantes sont possibles avec l'utilisation de sources monochromatiques ou des roues à filtres rapides et un miroir dichroïque multibande éventuellement associé à un filtre multibande d'émission.

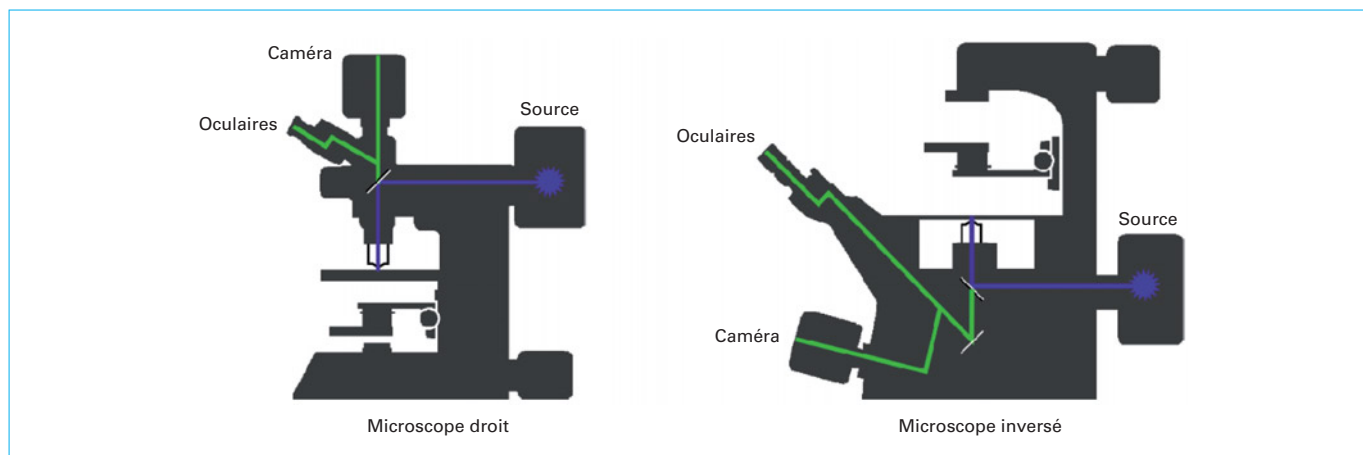


Figure 11 – Chemin optique des microscopes droit et inversé

En diascopie, l'observation s'effectue au travers d'un échantillon transparent. En épiscopie, l'échantillon est observé par réflexion. Dans le cas de la fluorescence, le préfixe « épi » indique que l'émission est observée du même côté que l'excitation, comme s'il s'agissait d'une réflexion.

2.1.2 Microscope droit ou inversé et dispositifs porte échantillons

Deux types de microscopes sont possibles en fonction du placement de l'objectif par rapport à l'échantillon (figure 11) : le **microscope droit**, pour lequel, l'objectif est au-dessus de l'échantillon et le **microscope inversé** pour lequel il est en dessous. Ils produisent des images de qualité égale en fluorescence.

Le microscope inversé permet une grande variété de supports pour l'échantillon : il permet d'observer des échantillons en milieu liquide, avec un couvercle gardant la stérilité, dans des boîtes de grande taille, etc. Pour cette raison, les microscopes inversés sont beaucoup plus utilisés en biologie avec des cellules vivantes. Le fond du support de l'échantillon doit être transparent pour la fluorescence, et compatible (épaisseur et qualité optique) avec les spécifications de l'objectif.

Les microscopes droits sont davantage utilisés avec des échantillons montés entre une lame et une lamelle de verre dans les domaines de l'histologie, de la cytologie et du diagnostic médical, et pour l'étude des préparations épaisses ou opaques, comme en neurophysiologie.

Le développement des techniques de construction de micro-supports transparents utilisables en microscopie de fluorescence a ouvert la voie à une technologie appelée « *Lab on a Chip* ». Ces supports sont constitués de canaux et des compartiments de taille micrométrique et dont la circulation des liquides et des cellules en suspension est contrôlée par l'expérimentateur, ce sont les techniques microfluidiques. Ces systèmes peuvent arriver à une grande complexité. Ils permettent de faire des mesures de fluorescences sur des milliers de conditions en parallèle sur une surface de quelques centimètres carrés (*Chip*) [7] [RE 17] [BIO 7 150].

2.2 Réponse impulsionnelle en microscopie de fluorescence

Comme dans tout système optique, le phénomène de diffraction transforme l'image (sur un plan xy perpendiculaire à l'axe optique

principal) d'un point lumineux infiniment petit en une tache circulaire entourée d'anneaux : la **tache d'Airy**, dont le rayon est déterminé par la longueur d'onde et l'ouverture numérique de l'objectif (figure 12). On parle aussi de **Réponse Impulsionnelle Optique** (RIO) ou de **fonction d'étalement du point** (*Point Spread Function* ou PSF). Dans les meilleures conditions, on mesure sa taille par le rayon du premier passage à zéro :

$$\sigma_x \approx 0,61 \frac{\lambda}{ON} \quad (4)$$

Les fréquences spatiales observables se situent dans un disque de rayon :

$$k = \frac{2ON}{\lambda} \quad (5)$$

Selon le critère de Rayleigh, deux points voisins de la préparation ne pourront être distingués que s'ils sont distants d'au moins σ_x .

En pratique, la résolution latérale (plan xy) se situe entre 0,6 μm pour un objectif de grandissement 10x et d'ouverture numérique 0,45 et 0,2 μm pour un objectif d'ouverture 1,4 (grandissement 40x à 100x). Dans tous les cas, avec des lentilles construites en verre, la limite de résolution est supérieure à $\lambda/3$. Cette limite de résolution a été considérée comme intrinsèque au microscope optique jusqu'à l'arrivée de nouvelles techniques détaillées dans la suite de cet article.

La fonction d'étalement du point s'étend dans l'espace au-dessus et en-dessous du plan de focalisation et produit une forme complexe d'anneaux imbriqués de plus en plus larges au fur et à mesure qu'on s'éloigne du point de focalisation. Sur les plans xz et yz, on parle de **résolution axiale**. Les panneaux A et B de la figure 12 montrent un modèle mathématique de PSF produit par un point source immergé dans un milieu d'indice 1,33 (milieu aqueux) et une optique en verre à immersion (huile 1,515). Ce modèle a été généré par le programme « *psf generator* » écrit par Hagai Kirshner and Daniel Sage [8].

L'expression de la résolution axiale (axe z) selon le critère de Rayleigh peut être estimée par :

$$d = \frac{2\lambda n}{ON^2} \quad (6)$$

avec n indice de réfraction du milieu.

La convolution de tous les points sources d'un objet fluorescent par la fonction d'étalement de l'instrument (PSF) produit une forte perte de contraste de l'image au plan de focalisation due à l'apport

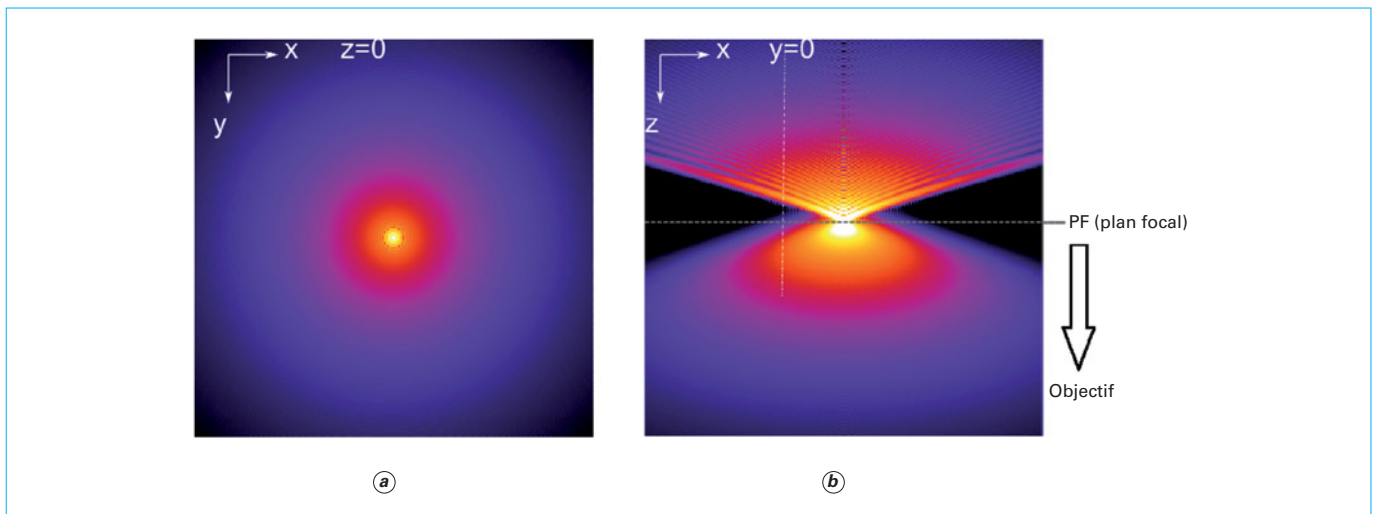


Figure 12 – Modèle mathématique de la fonction point source (ou Point Spread Function PSF) vue sous deux angles différents

des photons dans l'image en provenance des structures fluorescentes situées au-dessus ou en dessous du plan de focalisation (voir dans le paragraphe 4 le principe du microscope confocal qui permet de minimiser ces effets). Plus une préparation est épaisse et fortement marquée, plus cet effet sera gênant. C'est la principale limitation à l'utilisation du microscope plein-champ. Effectuer la mesure de la PSF expérimentale propre à un instrument donné et à une préparation donnée (milieu de montage, type de verre, type d'huile d'immersion, spectres de fluorescence, etc.) permet de caractériser l'instrument et de détecter des problèmes tels que des défauts d'alignement des optiques, des chocs subis par l'objectif ou des aberrations dégradant ses performances. La PSF expérimentale permet aussi de réassigner partiellement dans un espace 3D la provenance théorique des photons (par dé-convolution de l'image avec la PSF inverse) et ainsi de restaurer le contraste théorique du plan de focalisation observé.

2.3 Sources d'éclairage pour la microscopie de fluorescence

2.3.1 Lampes à arc

Trois types de lampes sont couramment utilisés comme sources de lumière d'excitation pour le microscope à fluorescence (figure 13).

Ce sont des lampes à arc à vapeur de mercure ou xénon ou des lampes à halogénures de métal actuellement les plus utilisées. Les spectres des lampes à vapeur de mercure et les halogénures métalliques (metal halide) sont caractérisés par cinq pics très intenses. Les valeurs de ces pics s'accordent plus ou moins avec les spectres d'excitation des molécules fluorescentes usuelles. L'intensité différente entre les différents pics empêche une comparaison directe de l'intensité de marquage entre deux fluorophores ayant des spectres d'excitation différents, les différences pouvant être dues uniquement à la puissance relative différente aux différentes longueurs d'onde.

Pour les applications de quantification par mesure d'intensité de fluorescence (mesure du calcium en solution par exemple), il est préférable d'utiliser une lampe à vapeur de xénon qui présente un spectre pratiquement plat. Les lampes à halogénures métalliques ont l'avantage d'avoir une puissance plus importante dans les zones entre les pics (par rapport aux vapeurs de mercure). Cela est

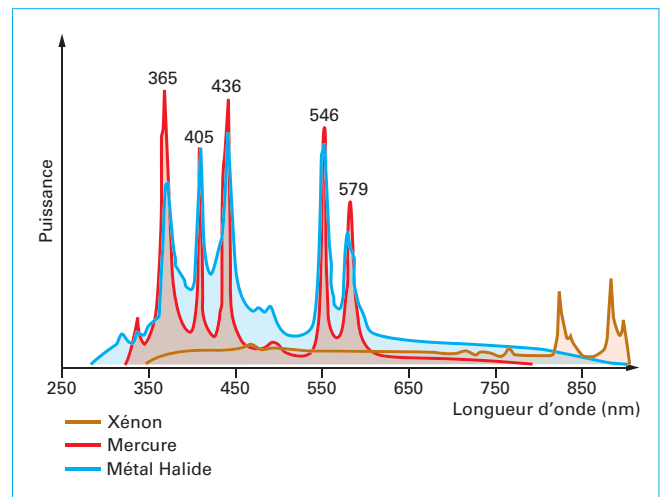


Figure 13 – Spectre de puissance des sources usuelles d'excitation de fluorescence

utile pour les fluorophores qui ont un maximum d'excitation dans ces zones (488 nm par exemple pour les dérivées du FITC et la GFP). Par ailleurs, les lampes à halogénures métalliques présentent une très bonne longévité, leur durée d'utilisation est de plus de 1 000 heures contre 200 heures pour les lampes à mercure ou xénon.

2.3.2 Diodes électro luminescentes

Les nouvelles générations de Diodes Électro Luminescentes (DEL ou LED en anglais pour *Light Emitting Diodes*) ont permis de construire des sources quasi monochromatiques basées sur la combinaison dans un boîtier de 3 à 7 DEL de couleurs différentes couvrant les besoins des fluorophores courants. Pendant longtemps, cette technologie a été limitée par un manque de puissance des diodes disponibles, mais il est actuellement possible d'obtenir des puissances comparables aux lampes à arc. Les DEL ont plusieurs avantages par rapport aux lampes. En premier lieu la longévité de l'ordre de 10 000 heures d'utilisation et la vitesse

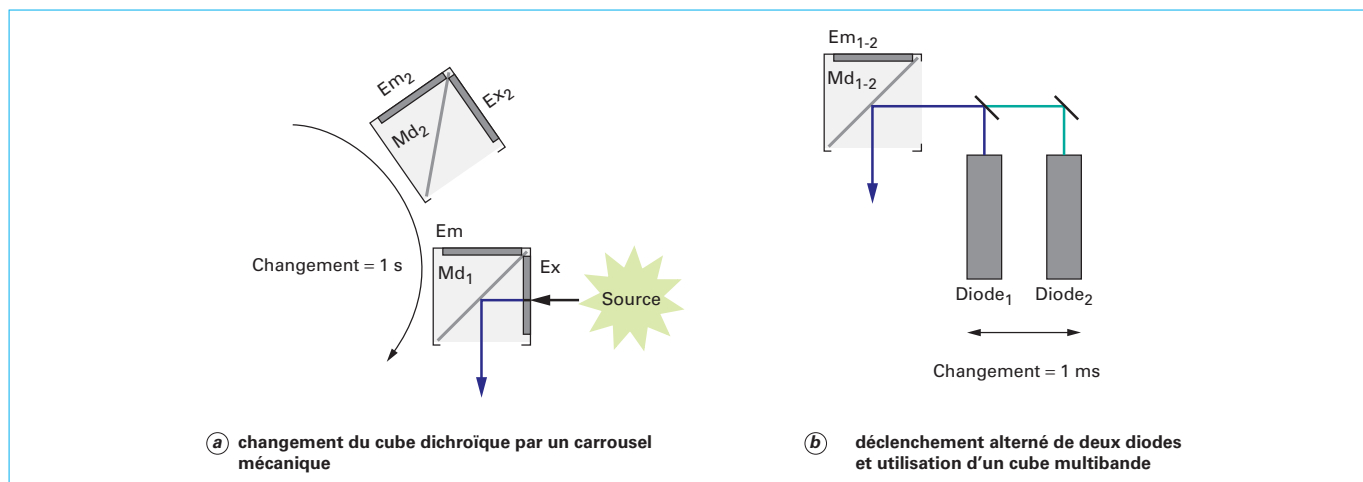


Figure 14 – Comparaison entre deux techniques d'excitation pour la fluorescence multicolore

d'allumage et d'arrêt de l'ordre de la picoseconde qui permet de se passer d'obturateur mécanique (réduction des vibrations). Il est possible d'utiliser leur spectre d'émission étroit (30 nm) combiné à un miroir dichroïque et à un filtre d'émission multibandes pour s'affranchir du changement de cube filtres entre deux fluorophores (figure 14).

3. Techniques d'observation d'objets épais

3.1 Obstacles à l'observation directe

3.1.1 Autofluorescence

L'étude des tissus biologiques en microscopie de fluorescence se heurte à plusieurs obstacles. Toutes les cellules possèdent une autofluorescence en l'absence de sonde appliquée. La principale bande d'émission dans la bande jaune-verte, entre 500 et 600 nm est due aux flavoprotéines lorsque l'excitation se situe dans le bleu autour de 450 à 480 nm. Le NADH émet dans le bleu (460 à 470 nm) lorsqu'il est excité dans l'UV autour de 360 nm.

3.1.2 Diffusion de lumière

Les tissus biologiques sont très hétérogènes, la lumière y est absorbée, mais surtout diffusée par les structures hétérogènes : granules, fibres de collagène, fibres musculaires, membranes lipidiques, stratum corneum. La « fenêtre optique » se situe entre 0,7 et 1,3 μm , où la lumière est moins diffusée, et moins absorbée par l'hémoglobine et la myoglobine.

3.1.3 Techniques pour rendre les tissus transparents

Afin de diminuer la diffusion de lumière, on cherche à donner au tissu un indice optique homogène, en particulier dans les tissus très diffusants comme la peau ou le système nerveux central [9]. Plusieurs moyens ont été mis en œuvre, comme le glycérol, le polyéthylène glycol, des mélanges de polymères et les milieux hyperosmotiques. Les tissus fixés sont préalablement déshydratés, puis traités par une séquence de solvants : tétrahydrofurane,

dichlorométhane, alcool benzylique et benzoate de benzyle (BAAB). Une alternative est une solution de fructose et de α -Thioglycérol qui présente un indice optique proche de 1,5, qui préserve mieux la fluorescence en protégeant du photo-blanchiment [10].

3.2 Microscopie à feuille de lumière

Initialement développée pour une prise d'image rapide, la technique d'éclairement à feuille de lumière (*Light Sheet Microscopy*) ou SPIM (*Selected Plane Illumination Microscopy*) permet d'observer un objet éclairé par un ruban de lumière via un objectif à longue distance de travail perpendiculaire à ce ruban (figure 15). Le plan d'éclairement est perpendiculaire à l'axe d'observation. L'observation s'effectue via un objectif de grande distance de travail et de faible ouverture numérique. L'image est formée sur une caméra, par la combinaison de l'éclairage cylindrique et de l'observation classique.

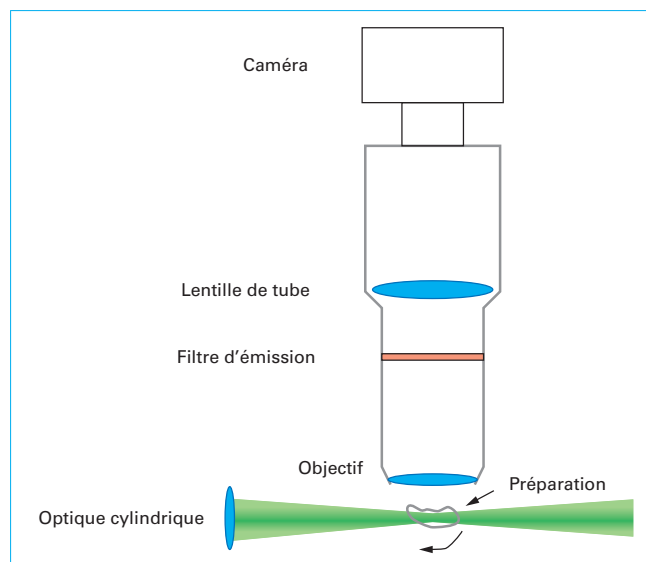


Figure 15 – Principe de la technique du feuillet de lumière (SPIM)

Plusieurs dispositifs peuvent être utilisés pour produire cette feuille de lumière.

Une optique cylindrique produit un faisceau gaussien d'épaisseur pratiquement constante entre 3 et 8 μm sur une zone de plusieurs centimètres.

D'autres dispositifs ont été décrits. Une version utilise le balayage rapide d'un laser dans un plan (*Digital Scanned Light Sheet Microscopy*, DSLM), éventuellement en excitation biphotonique (§ 4.1.2). Le plan de lumière le plus fin et le plus pénétrant que l'on puisse réaliser est le faisceau de Bessel. Une des options pour favoriser l'uniformité latérale est l'utilisation de sources multiples, ce qui est parfois appelé mSPIM.

Des variantes ont été réalisées avec deux objectifs opposés ou à 90°.

Cette technique s'avère peu phototoxique et permet des enregistrements de longue durée. Elle est utilisée par exemple en embryologie. Elle trouve également ses applications pour les objets de géométrie complexe, comme la cochlée.

L'obstacle principal est la dispersion du pinceau de lumière par diffusion, diffraction et absorption, qui ne permet pas un éclairage uniforme sur le plan de l'image.

La préparation peut être insérée dans un tube de verre centré sur le faisceau et une série d'images (typiquement 4 à 10) peut être réalisée après rotation du tube, ce qui permet une observation globale de la préparation pour une reconstruction en trois dimensions. Basée sur un principe simple et ancien, sa réalisation pour une imagerie scientifique de qualité est complexe, ce qui explique la lenteur de l'apparition des premiers dispositifs commerciaux. L'obtention d'un objet en volume à partir des différentes images en rotation et en translation, plus le suivi temporel demandent un traitement d'une masse de données de l'ordre de la centaine au millier d'images. Un premier modèle a été présenté par la société Zeiss en 2012.

4. Techniques de microscopie avancées

Dans cette partie, nous allons nous intéresser aux mesures d'intensité de fluorescence par microscopie qui constituent les techniques de l'imagerie de fluorescence. On n'abordera pas des mesures d'autres paramètres physiques de la fluorescence comme le temps de vie, le dichroïsme, etc.

4.1 Restriction de la zone explorée

Dans cette section nous allons décrire les techniques de microscopie particulières qui permettent de restreindre la taille de zone de « flou » créée par une source fluorescente. Les causes du flou sont principalement dues à l'éclairage des objets fluorescents en dehors du plan de mise au point et à la fonction d'étalement de l'image d'une source ponctuelle (« PSF »). Les différents microscopes confocaux et le TIRF décrits par la suite permettent d'améliorer la première situation et les techniques de super-résolution « restreignent » la PSF. Ces restrictions ont pour conséquence d'améliorer la résolution et le contraste des images obtenues. Tous les fabricants de microscopes à fluorescence proposent des produits commerciaux pour l'une ou l'autre de ces techniques.

4.1.1 Microscope confocal à balayage laser

Dans le microscope confocal [R 6 714] (figure 16), l'éclairage et l'observation ciblent une zone restreinte dans l'épaisseur de l'échantillon (axe z). Le balayage horizontal (plan xy) point par

point de cette zone sur toute la préparation permet d'obtenir l'image d'un plan à l'intérieur de la préparation, produisant un effet de « coupe optique ».

Le dispositif le plus utilisé repose sur un faisceau d'éclairage cohérent. Le faisceau d'un laser est élargi par un télescope (*beam expander*) pour former un faisceau homogène qui remplit la pupille d'entrée de l'objectif (une implémentation possible est schématisée dans la figure 16). Contrairement à l'éclairage « champ large », toute l'illumination est dans ce cas concentrée dans un point. L'angle d'incidence est déterminé à chaque instant par deux miroirs en rotation suivant en x et en y qui produisent un balayage de l'ensemble du champ. Un diaphragme micrométrique ou « *pinhole* » (terme consacré dans le domaine) dans le plan image de la lentille de tube restreint le passage des rayons à l'image du point focalisé. La mesure de fluorescence est effectuée à chaque instant en un point, par un photomultiplicateur ou un autre type de détecteur ponctuel.

Par rapport au microscope plein-champ, l'avantage principal est d'éliminer la contribution à l'image de la fluorescence provenant des plans défocalisés (inférieurs et supérieurs).

Les miroirs de balayage en x et en y sont très proches l'un de l'autre, et une lentille de balayage permet d'assurer le remplissage de la pupille d'entrée de l'objectif par le faisceau d'excitation, quel que soit l'angle du faisceau.

La restriction du champ par un *pinhole* s'effectue à l'éclairage et à la détection. Le domaine de fréquences spatiales observables en microscopie confocale est doublé. En pratique, on admet une amélioration de résolution de l'ordre de 40 % de la largeur à mi-hauteur de la fonction point source.

En restreignant l'amplitude de balayage des miroirs, on couvre une surface plus restreinte de la préparation, et à même fréquence d'acquisition, on produit un effet de zoom sans modification de résolution.

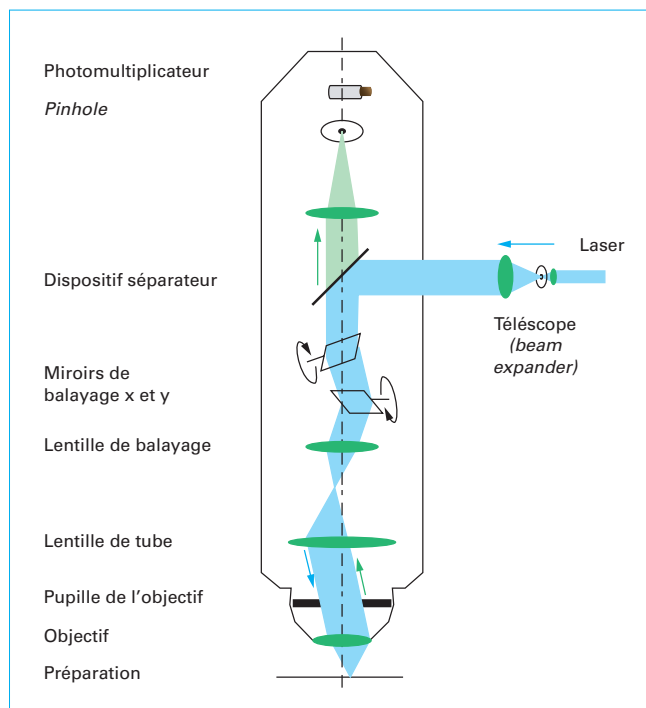


Figure 16 – Principe de montage d'un microscope confocal à balayage laser

4.1.2 Microscope confocal à balayage par absorption biphotonique

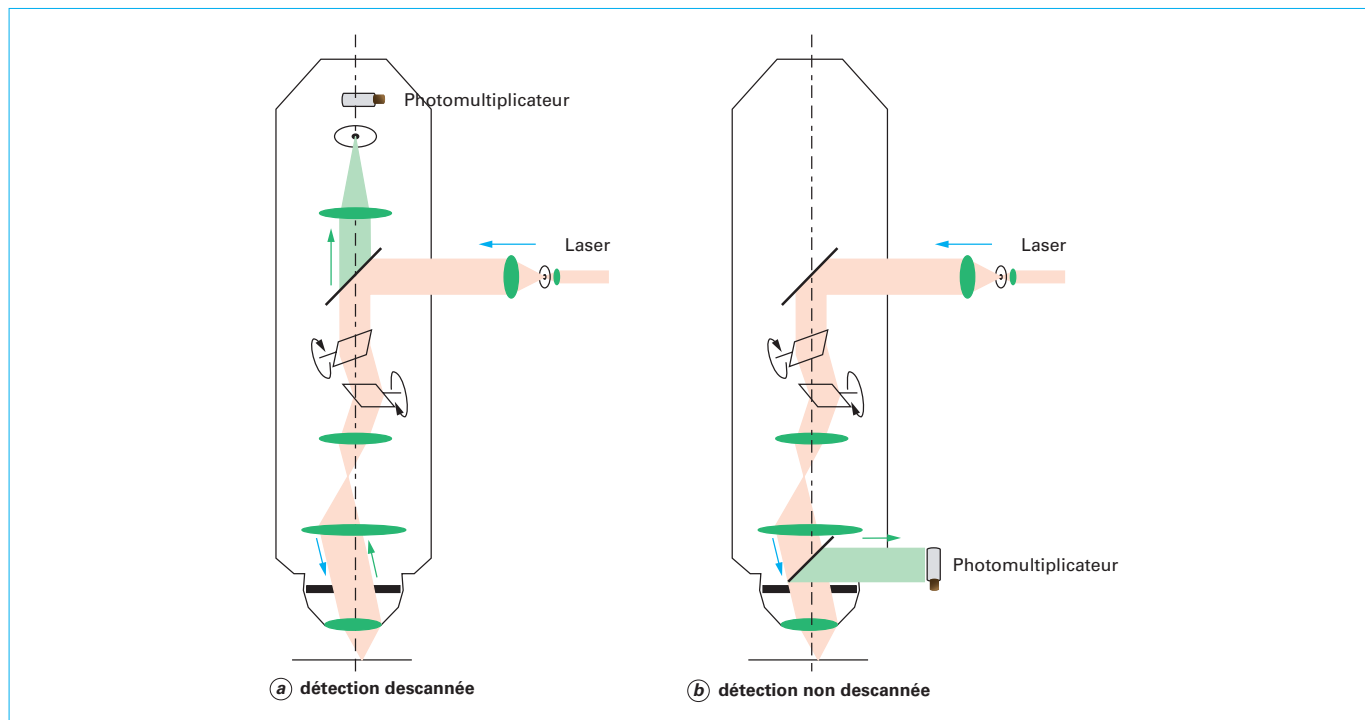
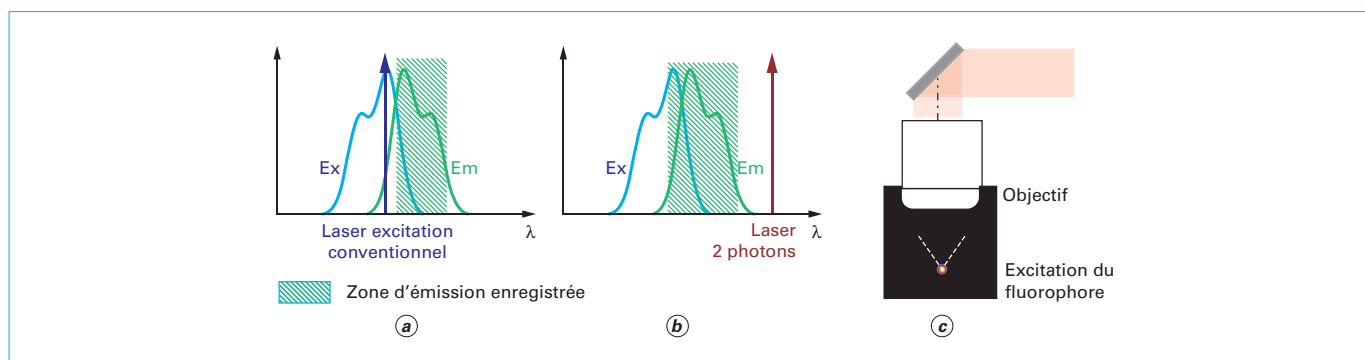
Une amélioration du dispositif a été apportée en utilisant non plus un laser continu (figure 17a), mais un laser impulsif infrarouge (en général Titane-Saphir) produisant des impulsions de l'ordre de 100 fs (1 femtoseconde = 10^{-15} s). On utilise l'excitation décrite par Maria Goeppert Mayer d'un état de fluorescence par l'absorption de deux photons dans un laps de temps très bref ($\sim 10^{-18}$ s). Le saut d'énergie requis pour faire passer un électron vers une orbitale instable peut être apporté par des photons d'énergie plus faible, donc situés dans l'infrarouge (figure 17b).

La probabilité d'absorber simultanément deux photons infrarouges (par exemple à 800 nm) est extrêmement faible par rapport

à l'absorption d'un seul photon bleu à 400 nm. Ce processus ne peut être efficace que si le flux lumineux est concentré temporellement (grâce à l'impulsion fs) et spatialement au point de focalisation de la lumière par l'objectif. Le volume d'excitation est alors grossièrement proportionnel au carré de l'intensité du flux (figure 17c).

Le confinement du flux lumineux en un point permet de se passer du *pinhole* du microscope confocal car c'est à l'excitation que le caractère confocal du processus se produit. On diminue ainsi les pertes dans l'optique avec une sortie dite « non-descannée » prise directement par un miroir dichroïque placé derrière l'objectif (figure 18).

Cette technique présente plusieurs autres avantages.



La longueur d'onde du laser d'excitation est plus éloignée de la zone de mesure, ce qui permet de recueillir une part plus importante du spectre d'émission et de ne pas être gêné par la lumière transmise par le laser exciteur.

La lumière infrarouge est beaucoup moins absorbée et diffusée dans les tissus que la lumière visible. Elle permet donc de stimuler et ainsi de faire des images à plus grande profondeur dans le tissu.

En n'excitant qu'un faible volume de préparation, ce type de stimulation est beaucoup moins délétère pour le fluorophore et minimise les phénomènes de photo-dégradation au cours du temps (*fading*). En neurophysiologie, cette technique a permis de découvrir des nouveaux phénomènes dans les tissus en profondeur.

L'accordabilité des lasers femtoseconde permet de couvrir une large gamme de fluorophores avec un seul laser et des avancées récentes (« *Insight DeepSee* » de Newport) permettent de couvrir une plus large plage dans l'infrarouge (680 à 1 300 nm, ce qui correspond à la gamme 390 à 650 nm en excitation à un photon).

Il y a des limitations. La zone efficace est plus concentrée que la tache d'Airy, mais dans les longueurs d'onde d'infrarouge, et il n'y a finalement pas d'avantage par rapport au microscope confocal classique au point de vue de la résolution. L'énergie du laser est limitée dans la pratique par la tolérance de l'échantillon biologique. L'optique produit une dispersion chromatique et un allongement de la durée de l'impulsion, qui peut être compensée par un dispositif dit de précompensation.

Les miroirs de cavité laser sont montés sur des systèmes piézoélectriques asservis qui automatisent leur réglage lors de changement de longueur d'onde. Il reste que ce type de dispositif est onéreux et délicat à mettre en œuvre.

4.1.3 Microscope confocal à disque tournant

Au lieu d'un balayage laser, on peut utiliser la technique du disque tournant (*spinning disk*). Le « **disque de Nipkoph** » est un disque comportant des trous répartis en spirale. Dans le « *spinning disk* », on utilise ces trous comme *pinholes* pour la confocalité (figure 19). Pour un bon rendement lumineux, deux disques sont couplés (**configuration de Yokogawa**), l'un comportant des lentilles disposées en spirales, et le second les *pinholes*. Le faisceau de lumière d'excitation est focalisé par une lentille et traverse le diaphragme de focalisation. Ces disques couplés tournent rapidement. Au niveau de la préparation, la focalisation du faisceau par

les lentilles et *pinholes* successifs produit un balayage rapide de l'ensemble de la surface. Au retour, le faisceau reprend le même chemin, et un séparateur permet de le focaliser sur une caméra. Le disque comporte plusieurs dizaines de milliers de *pinholes* et autant de lentilles.

Le microscope confocal à disque tournant ne permet pas de zoom comme le microscope à balayage laser. L'enregistrement simultané à plusieurs couleurs est complexe et onéreux.

L'éclairage par ce dispositif est moins délétère pour les préparations vivantes, c'est l'outil de choix pour l'étude de longue durée.

4.1.4 Microscopie à éclairage évanescent (TIRF)

Une nouvelle approche a été développée à partir des années 1980 pour améliorer très sensiblement la résolution verticale. La technique TIRF (*Total Internal Reflection Fluorescence*) utilise une illumination au-delà de la limite de réflexion totale.

Un faisceau de lumière incident sur un dioptre d'un milieu de fort indice n_2 vers un milieu de faible indice n_1 produit une partie réfléchie et une partie réfractée, tant que l'angle d'incidence est inférieur à une certaine limite :

$$i = \sin^{-1} \left(\frac{n_1}{n_2} \right) \quad (7)$$

Au-delà de cette limite, il y a réflexion totale. Il existe cependant un champ électromagnétique non-radiatif au niveau de l'interface, qui décroît rapidement en profondeur (décroissance exponentielle du champ en fonction de la distance par rapport à l'interface). Cette propriété est exploitée en microscopie à éclairage évanescent.

Les premières implémentations en microscopie (figure 20a) ont utilisé un éclairage oblique de la préparation à partir d'un prisme de quartz (indice optique 1,44) posé sur une lamelle de verre sur laquelle étaient attachées des cellules.

Les dispositifs commerciaux utilisent en général sur un microscope inversé (figure 20b) la différence d'indice entre le verre et la solution aqueuse dans laquelle reposent des cellules. En se plaçant en réflexion totale à proximité de la limite, on obtient une onde suffisante pour exciter la fluorescence de molécules situées à quelques dizaines de nanomètres de la surface.

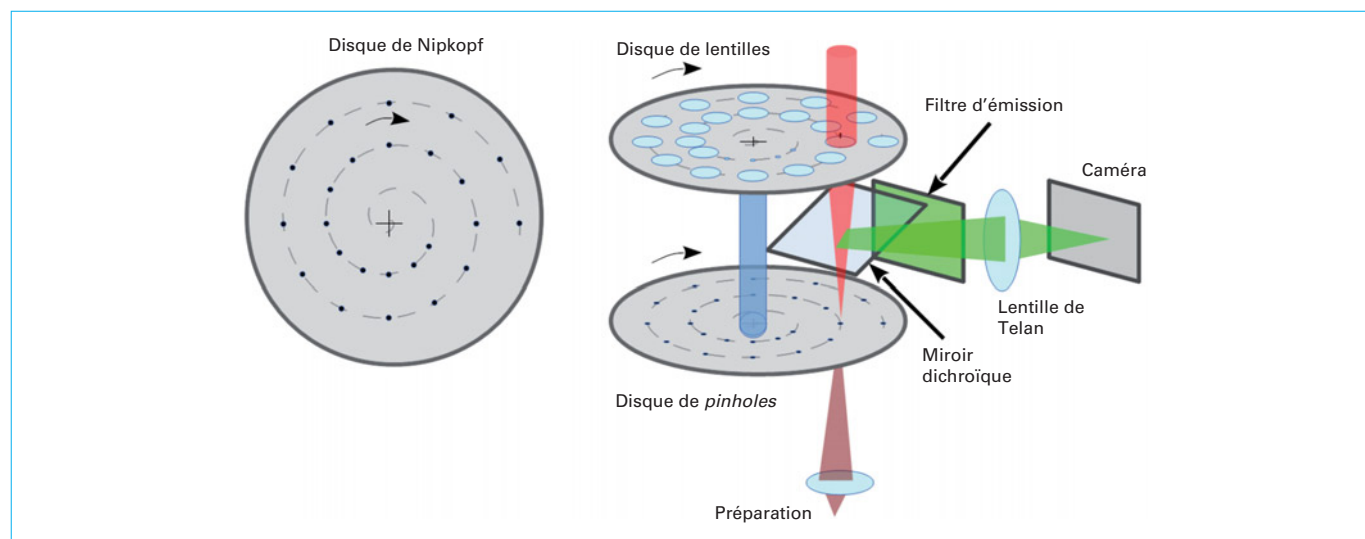


Figure 19 – Principe de montage du microscope confocal à disque tournant (*Yokogawa Spinning Disk*)

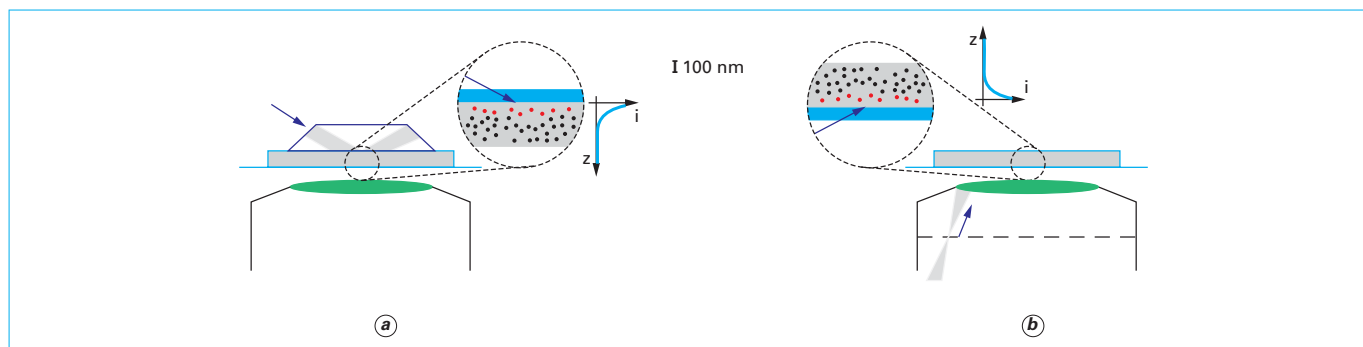


Figure 20 – Principe d'éclairage évanescent (TIRF) par prisme (a) ou par l'objectif (b)

En pratique, un faisceau laser est focalisé sur le plan focal arrière d'un objectif à très forte ouverture numérique. L'ouverture numérique doit être supérieure à l'indice de la solution et du tissu biologique (proche de 1,33), et en pratique, il faut plus de 1,4. Certains constructeurs proposent des objectifs d'ouverture numérique supérieure à l'indice du verre normal, moyennant l'utilisation de verres spéciaux, et d'une huile d'immersion à indice plus élevé (1,6 au lieu de 1,516 selon le standard ISO 8036 : 2006).

L'avantage principal de cette technique est la restriction de la zone explorée verticalement à quelques dizaines de nanomètres. De ce fait, elle est bien supportée par les préparations vivantes car une faible proportion des molécules fluorescentes est excitée. Le rapport signal sur bruit peut être sensiblement amélioré et le contraste de petits objets est meilleur car le flou dû au volume de l'échantillon est éliminé. Cette technique ne présente pas strictement d'avantage pour la résolution horizontale par rapport au microscope plein-champ. Le TIRF est maintenant utilisé en combinaison avec d'autres techniques de super-résolution.

4.2 Techniques de super-résolution

Toutes les techniques précédentes ont une résolution limitée par la tache de diffraction liée à l'ouverture numérique, longtemps présentée comme infranchissable. Il se trouve que de nombreux organites cellulaires ont une taille de l'ordre de 100 à 200 nm, précisément à la limite du domaine observable. De nouvelles techniques dites de super-résolution sont apparues depuis les années 1990 permettant de passer outre. Le prix Nobel de chimie 2014 a récompensé ces découvertes.

Une première approche consiste à augmenter l'ouverture numérique du dispositif optique, et de doubler la résolution. Une

deuxième approche utilise un phénomène non-linéaire. Il est alors possible de s'affranchir de la limite théorique de résolution, mais une limite pratique reste fixée par l'utilisateur en fonction du rapport signal sur bruit.

4.2.1 Techniques permettant un doublement de résolution

4.2.1.1 Doublement de la résolution par illumination structurée

L'illumination structurée SIM (*Structured Illumination Microscopy*) revient à former sur le plan de la préparation des figures de moirés [11]. Dans sa forme classique, on éclaire la préparation par un faisceau dont l'intensité est sinusoïdale dans une direction. Comme dans un système hétérodyne en électronique, on produit des interférences d'intensité avec la réponse de la préparation. Cela revient à décaler les fréquences spatiales de la préparation de la fréquence spatiale de l'éclairage, qui doit être un peu inférieure à la fréquence maximum observable. La figure 21a montre une représentation schématisée d'un objet en microscopie plein-champ. Plusieurs vues successives sont prises en décalant la phase de la stimulation (représentées par les colonnes dans la figure 21b). Il faut recommencer l'opération avec plusieurs directions de faisceau d'éclairage, par exemple tournées de 60° (représentées en lignes dans la figure 21b).

De l'ensemble des images obtenues, on peut calculer la transformée de Fourier de l'image de la préparation dans un domaine de fréquences étendu par décalage. Ce dispositif permet en théorie de doubler le domaine de fréquences, donc de diviser par deux la limite de résolution (figure 21c).

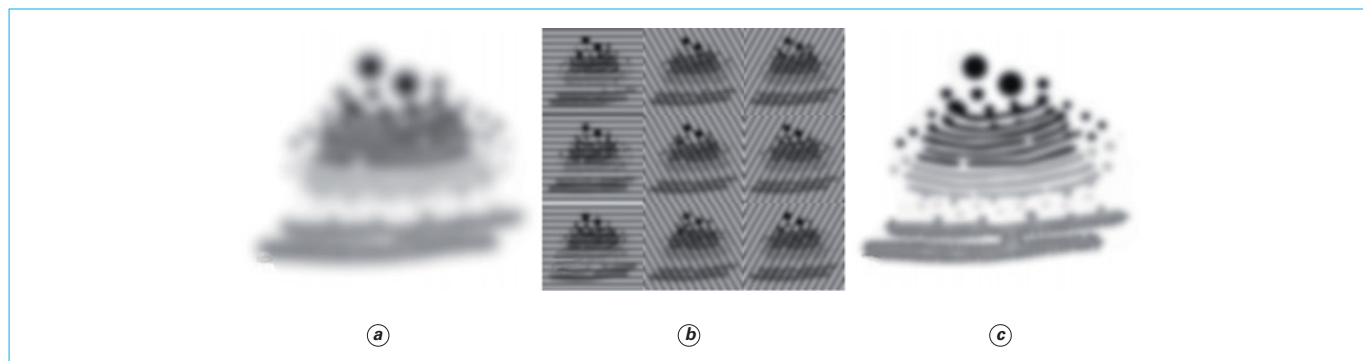


Figure 21 – Principe de la microscopie en illumination structurée (a) schéma de l'image diffractée normale (b) série d'images obtenues par un masque en 3 orientations et 3 phases différentes (c) image SIM reconstruite à partir des 9 images précédentes

Il faut donc prendre un certain nombre de prises de vues et effectuer des calculs pour obtenir une image à plus haute résolution. On retrouvera ce principe sur beaucoup d'autres techniques de super-résolution.

De nombreuses variantes existent, produisant des stimulations de type sinusoïdales ou rectangulaires, qui ont été développées comme systèmes commerciaux.

La multiplication d'images « simultanées » nécessaires impose que la dynamique des objets observés soit lente par rapport au temps de prise de vue. Le dispositif optique doit être parfaitement maintenu ou asservi. Ces exigences limitent l'utilisation sur des préparations vivantes.

Plusieurs appareils basés sur ce principe sont actuellement commercialisés par les constructeurs de microscopes et par GE Healthcare Life Sciences' DeltaVision (système OMX).

En utilisant une stimulation de forte intensité, la fluorescence sature et génère des composantes harmoniques. Il est possible de tirer profit de ces hautes fréquences pour reconstruire une image sans limite de résolution (**technique du SSIM**, pour *Saturated Structured Illumination Microscopy*). Cette technique ne semble pas applicable dans l'état à des préparations vivantes.

4.2.1.2 Doublement de la résolution grâce à deux objectifs

Un dispositif permet de doubler la résolution dans le plan xy, mais apporte une amélioration bien supérieure dans la direction axiale.

Il a été mis au point en plaçant face à face deux objectifs à forte ouverture numérique focalisés dans le même plan.

Dans une version appelée « *Image Interference Microscopy* » ou I2M, la préparation est illuminée par une source incohérente via un des objectifs et l'image est formée par la combinaison des images recueillies par les deux objectifs (figure 22a). Le chemin optique des deux faisceaux est identique, et la figure d'interférence formée par les deux images sur le capteur contient une information axiale augmentée.

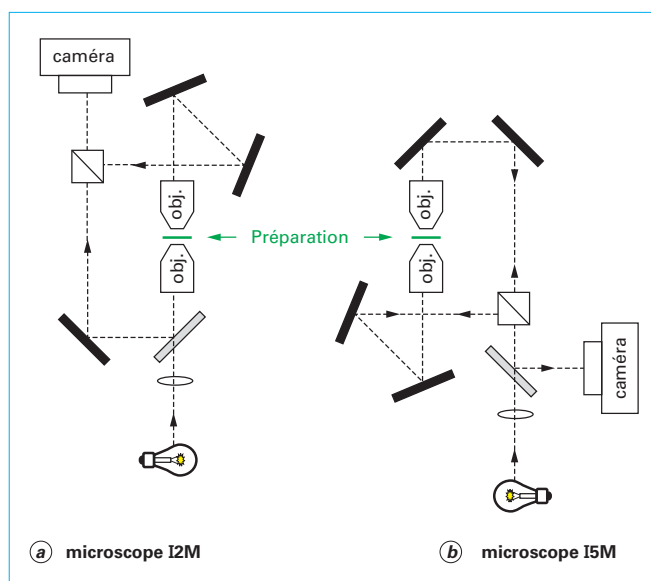


Figure 22 – Principe du montage optique de super-résolution avec deux objectifs. Microscopes I2M et I5M

Les franges d'interférence qui se produisent à l'illumination font apparaître des pics le long de l'axe, ce qui se traduit par des « images fantômes ». On y remédie par traitement numérique.

Dans une version améliorée dite I5M (elle met en jeu cinq miroirs), la préparation est illuminée au travers des deux objectifs (figure 22b) [12]. Le chemin optique étant identique, l'interférence des deux bras d'éclairement est maximum au centre, et négative à une distance $\lambda/4$ du centre, lorsque la différence de chemin vaut $\lambda/2$. Cette technique apporte une amélioration considérable en résolution axiale, atteignant 70 nm au lieu de 350 nm en microscopie confocale et pratiquement le double en microscopie plein-champ. Cette technique élégante présente des limitations : elle nécessite un alignement parfait des deux objectifs opposés et des positions des miroirs. L'espace de travail entre deux objectifs à forte ouverture numérique est restreint.

Une version particulière de ce montage a fait l'objet d'un dispositif commercial sous le nom de « **microscope 4π** » développé par Leica Microsystems. Dans ce système basé sur un balayage et non plus sur une approche plein-champ, l'illumination est remplacée par un laser à impulsions brèves pour travailler en fluorescence par absorption à deux photons.

4.2.2 Super-résolution sans limite, approche RESOLFT

Pour atteindre une résolution sans limite théorique, on doit s'affranchir de la convolution par la PSF du système optique. Plusieurs approches sont rassemblées sous l'étiquette dite **RESOLFT** (*Reversible Saturable Optical Transitions*) [5]. Elles utilisent toutes le basculement réversible d'une molécule fluorescente entre un état émetteur et un état éteint. On peut les grouper en deux familles :

- dans une première (STED, GSD), l'image est construite par balayage point par point et la lumière enregistrée par un capteur de type photomultiplicateur. On crée un faisceau de masque par une seconde source lumineuse, avec une zone d'ombre aussi petite que l'on souhaite en son centre. La zone fluorescente observée est limitée par ce « masque » ;
- dans une seconde approche (PALM, STORM et « approche statistique »), une caméra enregistre plusieurs milliers d'images successives, et la position des molécules fluorescentes est déterminée par calcul.

4.2.2.1 Technique STED (STimulated Emission Depletion) et STED 3D et GSD (Ground State Depletion)

Dans cette famille de techniques, la tache fluorescente d'un point est réduite par application d'un masque annulaire. Pour construire le faisceau de masque, on fait passer un flux de lumière cohérent et homogène au travers d'une lame de phase, de telle façon que deux points symétriques produits soient en opposition de phase.

Lorsque ce faisceau est focalisé sur le plan de l'image, l'illumination crée une forme de beignet (figure 23). La taille de la zone centrale non éclairée n'est pas limitée par le critère d'Airy et peut être réglée en théorie aussi petite qu'on le souhaite. Le balayage du faisceau d'excitation et du faisceau d'extinction s'effectue comme dans un microscope confocal, mais la taille de la mesure du point n'est plus limitée par la tache d'Airy.

La technique du STED [13] est basée sur l'utilisation de l'émission stimulée [AF 3 270]. Lorsqu'un atome précédemment excité reçoit un photon dans sa bande d'émission, il se produit une émission de deux photons identiques (direction, longueur d'onde et phase). Sur chaque point du balayage, la séquence est la suivante (figure 24) :

- 1) on produit un flash d'excitation de la taille du disque d'Airy ;
- 2) un deuxième laser de longueur d'onde proche du maximum d'émission du fluorophore produit un faisceau plus large, en forme

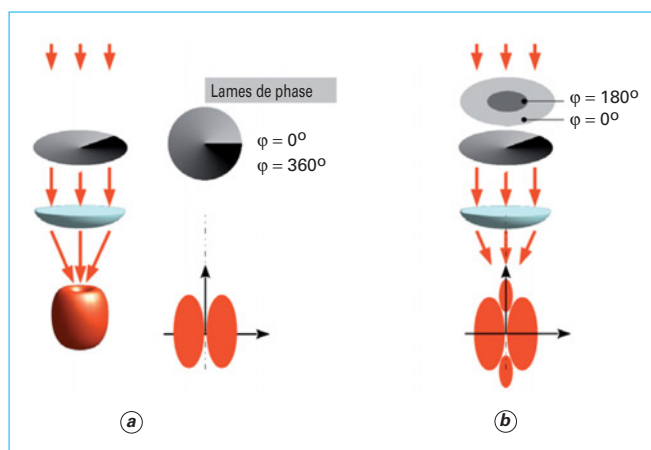


Figure 23 – Schéma de principe d'un masque en beignet en 2D (a) ou en 3D (b)

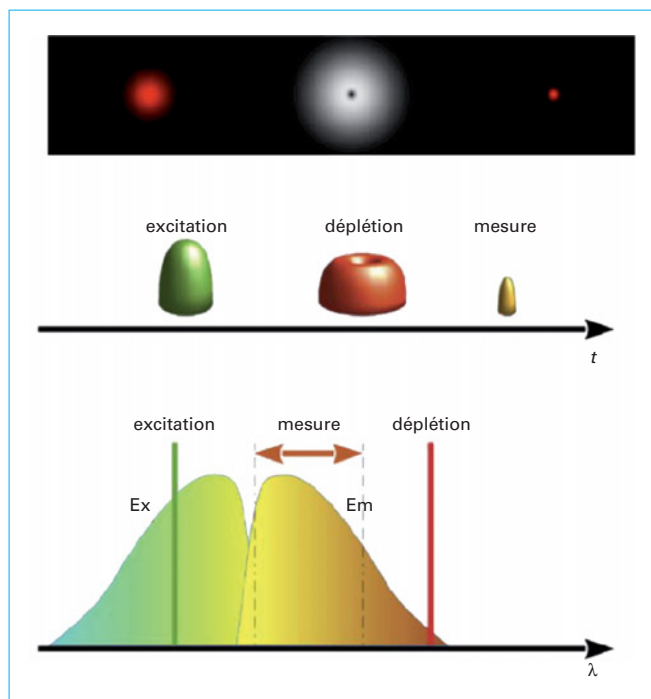


Figure 24 – Séquence temporelle et représentation spectrale pour la mesure d'un point en STED

de beignet (*doughnut*), ce faisceau désexcite par émission stimulée la zone excitée à l'exception d'une région centrale aussi petite que l'on veut. C'est l'étape de **déplétion** ;

3) l'émission de fluorescence de cette région est mesurée par le photomultiplicateur.

L'ajout d'une lame de phase supplémentaire ayant une zone centrale de déphasage de π en amont de la lame hélicoïdale permet d'effectuer un confinement en volume de la lumière de STED, pour pouvoir imager en trois dimensions. La production de ce motif axial a secondairement pour effet d'améliorer encore la résolution latérale. On arrive à une localisation verticale de l'ordre de 100 nm, soit cinq fois meilleure qu'en microscopie confocale.

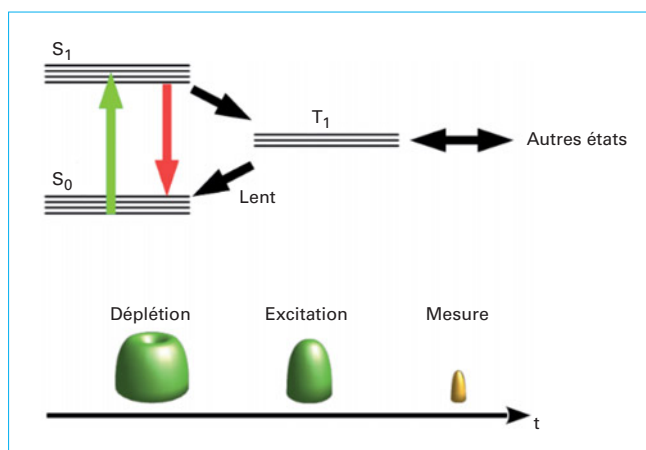


Figure 25 – Séquence temporelle pour la mesure d'un point en GSD

Cette technique a été initialement décrite pour des lasers impulsifs. Une option ultérieure permet d'utiliser un laser continu (discuté dans [14]).

Le STED est une technique puissante qui a permis d'atteindre la résolution de 16 nm (et en dessous du nanomètre avec une optique en diamant). Elle est commercialisée en version 2D et en version 3D par la société Leica Microsystems. Les alignements optiques doivent être très précis, ainsi que la synchronisation temporelle des séquences. Il faut deux lasers, la puissance du laser de STED est élevée : au moins 10^8 W/cm^2 , le choix du fluorophore est important [15].

4.2.2.2 Technique de GSD

La technique du GSD (figure 25) est basée sur les propriétés intrinsèques de tout fluorophore, possédant un état fondamental noté S_0 , un premier état excité S_1 et un état triplet T_1 métastable (on arrive à l'état triplet à partir de l'état excité par inversion de spin de l'électron). Sous illumination continue intense, la majorité des atomes passent à l'état triplet. On peut donc utiliser cette propriété pour masquer la zone voisine du point central. Dans la configuration GSD, on applique d'abord une stimulation masquante pour dépléter l'état S_1 au profit de l'état triplet T_1 , puis la stimulation de fluorescence normale. Par rapport au STED, le GSD permet une synchronisation simplifiée et n'utilise qu'un seul laser.

En revanche, cette technique est limitée par la dégradation oxydative des molécules à l'état triplet. Pour permettre le retour de l'état triplet vers l'état fondamental, le potentiel redox du milieu doit être contrôlé par addition d'agent réducteur, dithiothreitol, glutathione, ou mercaptoéthanol. Ce dispositif est commercialisé par Leica Microsystems.

4.2.2.3 Principe des techniques pointillistes de PALM/FPALM et STORM

Le PALM (*Fluorescence/Photo/Activated Localization Microscopy*) et le STORM (*Stochastic Optical Reconstruction Microscopy*) sont deux techniques d'imagerie plein-champ qui utilisent une caméra ultrasensible. L'idée de base consiste à créer des conditions dans lesquelles seulement quelques molécules sont fluorescentes, les autres étant « éteintes ». Cette extinction (ou masquage) est produite par une stimulation lumineuse différente de celle de l'excitation. Contrairement aux approches précédentes, on procède à un masquage sur l'ensemble du champ de l'image. On ajuste l'étape d'extinction des fluorophores actifs pour qu'ils soient séparés par une distance plus grande que la limite de résolution (résolus optiquement).

Les expériences sont menées dans un plan horizontal de faible épaisseur soit par une coupe fine nanométrique de tissu, soit en éclairant l'échantillon sur une fine zone par la technique d'éclairage évanescent (TIRF) ou avec un éclairage oblique dit HILO (*Highly Inclined and Laminated optical Sheet*) [16].

Dans ces conditions, les photons issus de chaque molécule fluorescente produisent une tache distincte composée d'un nombre N de plusieurs centaines à plusieurs milliers de photons. Un calcul de barycentre permet de déterminer la position centrale de chaque tache avec une précision en $\frac{1}{\sqrt{N}}$. On ne conserve alors de l'image que le point central. Une première approche suggère que l'incertitude σ sur sa position horizontale est approchée en fonction de l'écart-type de la PSF s , et le nombre de photons détectés dans une tache N , par :

$$\sigma = \frac{s}{\sqrt{N}}$$

Une formule plus exacte est donnée par la formule :

$$\sigma = \sqrt{\frac{s^2 + \left(\frac{a^2}{12}\right)}{N} + 4 \frac{\sqrt{\pi s^3 b^2}}{aN^2}} \quad (8)$$

avec σ écart-type de la PSF,

a taille du pixel de la caméra,

s écart-type du fond,

N nombre de photons détectés dans une tache.

On va répéter le cycle plusieurs dizaines de milliers de fois : extinction de la plupart des fluorophores, excitation de fluorescence de molécules éparses, extinction des molécules qui étaient lumineuses. À chaque étape, on traite l'image recueillie en créant une image de points correspondant au barycentre de chaque tache.

Il suffit de recueillir 100 photons par tache au cours d'un cycle, pour que la résolution « normale » de 250 nm obtenue avec un objectif à forte ouverture numérique, permette une précision de localisation de 25 nm.

La superposition de tous les barycentres constitue une image résultante « pointilliste » (figure 26). On parle de précision de pointage et non pas de résolution, chaque structure étant localisée à quelques nanomètres près.

Cette précision de localisation ne suffit pas pour caractériser la qualité globale de l'image. Celle-ci doit contenir un grand nombre de points pour être résolue. Pour convertir la notion de précision en résolution, le théorème de Shannon spécifie qu'il faut disposer d'au moins deux points de mesure pour un pas de numérisation. Pour pouvoir attribuer une tache à une seule molécule, deux molécules actives simultanément ne doivent pas être plus proches que le rayon d'Airy. Il faut donc activer une proportion très faible de molécules à chaque prise de vue. En d'autres termes, il faut faire un compromis entre la précision de chaque point et la densité de points de l'image. Cela peut se faire par ajustement de l'intensité de l'exposition, donc le nombre de photons recueillis et la précision de chaque point, le nombre d'expositions et le temps total de la prise d'images.

Exemple : pour disposer d'une résolution de 20 nm, il faut au plus 10 nm entre deux points, soit une densité de molécules de 10^4 par μm^2 . Une tache d'Airy de $250 \mu\text{m}$ de diamètre contient 600 molécules fluorescentes, dont toutes doivent être éteintes sauf une à un instant donné. Si on se rapporte à la réaction :



Cela impose un ratio :

$$k = k_{\text{off}}/k_{\text{on}} > 600 \quad (10)$$

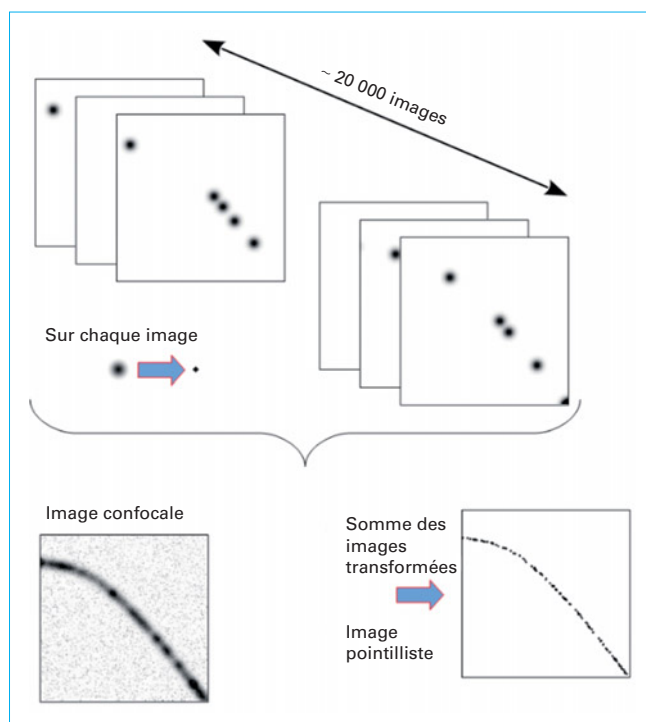


Figure 26 – Principe des techniques pointillistes (PALM et STORM)

Le rapport k , aussi élevé que possible, caractérise la qualité de l'image en complément de la précision de localisation de chaque point [17].

La précision obtenue approche de la taille d'une immunoglobuline G (environ 7 à 8 nm), et la taille d'un anticorps (10 à 15 nm) utilisé pour marquer une molécule d'intérêt commence à devenir critique. En effet, il faut tenir compte du fait que les techniques de marquage fluorescent révèlent la position du rapporteur fluorescent et non de la cible d'intérêt biologique elle-même. La distance entre les deux, de quelques nanomètres à quelques dizaines de nanomètres, est négligeable avec les techniques conventionnelles mais doit être prise en compte lorsque la super-résolution permet d'arriver à ce niveau de précision dans la localisation.

Un des avantages de ces techniques est la simplicité des dispositifs requis, fondamentalement un microscope classique, un dispositif d'éclairage évanescent et les lasers.

Les techniques de PALM et de STORM diffèrent dans la manière de commuter d'un état fluorescent à un état non-fluorescent, et utilisent différents types de sondes et de stimulations lumineuses. La technique de PALM s'adresse initialement à des protéines fluorescentes, moins lumineuses que les molécules chimiques utilisées dans le STORM (typiquement, 100 photons par événement au lieu de 1 000).

Le PALM utilise la modulation d'une protéine fluorescente, Eos, GFP photoactivable, molécules organiques de synthèse, boîtes quantiques ou hybrides de ces composants. Dans un premier temps, la préparation est éclairée jusqu'à photo-blanchir la plupart des molécules de fluorophore. À ce stade, une stimulation à une autre longueur d'onde permet de réactiver une petite proportion des molécules. Un enregistrement est effectué, et on répète ainsi de suite réactivation et enregistrement plusieurs dizaines de milliers de fois. Une des caractéristiques de la technique du PALM est qu'elle permet d'étudier la molécule unique sur des tissus contenant une densité importante, jusqu'à 10^5 fluorophores par μm^2 .

Le STORM utilise une sonde composée de deux cyanines (Cy3) et (Cy5) couplées à quelques dizaines de nm. Cette sonde est photoconvertible ou photochromique. Sous l'effet d'une source lumineuse rouge, la Cy5 émet dans le rouge lointain, puis passe dans un état éteint (*dark state*). Elle est réactivée par l'action d'une lumière verte qui excite la Cy3. La photoconversion des cyanines sous l'effet de la lumière est amplifiée en présence d'agents réducteurs (thiols). Cette réaction d'activation et de réactivation peut être répétée une centaine de fois ou plus. D'autres paires d'activateurs et rapporteurs ont été développées. Il est même possible d'activer des sondes avec une seule Cy5 directement, ce qui permet de définir la technique de dSTORM [18] par opposition à la technique initiale [19].

La technique du STORM s'applique maintenant sur des préparations vivantes comme sur des préparations fixées.

La technique PALM est proposée par Zeiss dans le système Elyra. Le STORM a été développé par NIKON. Il faut ajouter la variante « plein-champ » de la technique de GSD, dite GSDim, développée par Leica. De fait, ces systèmes sont facilement interchangeables.

4.2.2.4 Applications PALM/STORM en trois dimensions

La tache formée par chaque molécule unique ne porte qu'une seule information, la position de son barycentre. Plusieurs techniques ont été proposées pour porter l'information verticale. La technique BIPLANE, consiste à faire deux images focalisées dans deux plans et à déterminer la composante z par interpolation.

Une approche plus complexe, DH-PSF (*Double Helix Point Spreading Function*), consiste à produire une PSF hélicoïdale, telle que l'image d'un point soit formée de deux points symétriques de l'axe, l'orientation du segment des deux points mesurant la hauteur.

Dans une troisième technique, une lentille cylindrique dans la zone optique « à l'infini » entre l'objectif et la lentille de tube (figure 10) produit deux plans focaux différents en x et en y . La PSF sera approximativement circulaire pour un point à mi-chemin entre le plan de focalisation en x et celui en y . Si ce point s'éloigne de ce plan, la PSF aura une forme elliptique dans un sens ou dans l'autre, et la direction de l'ellipticité sera un indicateur de la position en z . Cette méthode apporte une précision de localisation verticale de l'ordre de 50 nm, la précision horizontale étant de l'ordre de 25 nm [20]. Alors que les techniques précédentes permettaient une gamme d'étude de quelques micromètres, celle-ci permet une investigation sur plusieurs dizaines de micromètres, de l'ordre de grandeur de la dimension d'une cellule vivante.

4.2.2.5 Super-résolution par calcul

Une méthode utilise uniquement une sonde qui bascule spontanément entre un état fluorescent et un état sombre (*blinking*). On exploite une séquence d'images de manière statistique. C'est la méthode dite SOFI pour *Super resolution. Optical Fluctuation Imaging* [21]. Elle suppose des sources de fluorescence individuelles indépendantes, immobiles dans une série d'images. L'échantillonnage spatial est tel qu'un pixel contienne au plus l'image d'une seule source. Chaque point (x, y) de l'image perçoit la source qui se projette sur ce point ainsi que la lumière diffractée des sources se projetant sur les points voisins. La fonction d'autocorrélation temporelle de la lumière en un point fait intervenir la corrélation entre la fluctuation de la lumière en ce point et celle des points voisins, que l'on suppose non corrélées.

L'image SOFI (d'ordre n) est issue de la fonction d'autocorrélation généralisée :

$$C_n(x, y, \tau_1, \tau_2, \tau_3 \dots \tau_n) \quad (11)$$

du signal lumineux $L(x, y, t)$.

$$C_n(x, y, \tau_1, \tau_2, \tau_3 \dots \tau_n) = \langle L(x, y, t + \tau_1) L(x, y, t + \tau_2) \dots L(x, y, t + \tau_n) \rangle$$

En chaque point, l'influence de la fluctuation se projetant sur les points voisins est atténuée. Autour de l'image d'une protéine, cette fonction croît comme la PSF à la puissance n . Le résultat est une augmentation de la résolution de l'image [21]. On obtient au final l'intensité que produirait un dispositif dont la PSF serait élevée à la puissance n . Cette méthode est applicable à des fluorophores qui clignotent spontanément à un rythme de l'ordre de grandeur de la fréquence de prise de vue, comme les boîtes quantiques (*quantum dots*) ou à certaines molécules organiques comme la protéine Dronpa dans un milieu contrôlé. Les limitations de cette approche sont liées au fait que tous les fluorophores ne sont pas utilisables, aux contaminations par des fluctuations issues des capteurs, et accessoirement au temps de calcul qui augmente exponentiellement avec l'ordre n .

5. Capteurs d'image

En fluorescence, le niveau de lumière est faible, l'efficacité et le bruit parasite des capteurs vont jouer un rôle significatif dans l'image finale. Selon la technologie utilisée, l'image sera acquise point par point, ligne par ligne, ou, le plus souvent, par remplissage direct d'un capteur matriciel de type caméra CCD.

Les capteurs sont caractérisés par l'efficacité quantique et par leur niveau de bruit. L'efficacité est mesurée en % d'électrons par photon. Elle dépend de la longueur d'onde et peut approcher 95 %.

Le bruit thermique est un phénomène stochastique de production d'électrons en l'absence de source lumineuse. Ce bruit est grossièrement doublé tous les 8 °C. Les capteurs seront refroidis, soit à une température légèrement supérieure à 0 °C ; soit plus bas, jusqu'à -90 °C, en prenant en compte le risque de givre et de condensation (soufflerie d'air sec, par exemple).

Sur les caméras, le bruit de lecture est l'incertitude au moment de la mesure. Il est mesuré en nombre d'électrons, entre 0,7 et 50 selon la technologie.

Les informations qui suivent sont très succinctes, on se reportera au document sur l'imagerie à bas niveau de lumière [E 6 570] pour plus d'informations. Les technologies initialement réservées à l'astronomie sont maintenant principalement développées pour les applications biologiques.

5.1 Détecteurs matriciels

Tous les modèles de microscopes modernes ont un chemin optique alternatif aux oculaires appelé « sortie vidéo » qui permet de placer un capteur sur le plan image.

Les supports argentiques ont été remplacés par des capteurs électroniques, de type CCD (*Charge Coupled Device*) ou CMOS (*Complementary Metal Oxide Semiconductor*).

Dans les deux technologies, le capteur est divisé en éléments (*picture elements* ou pixels) arrangés en tableau. Chaque élément est composé d'un détecteur CMOS comprenant une fine couche soumise à un champ électrique dans laquelle un photon va produire une paire électron-trou. Les électrons produits sont collectés dans une zone isolante du côté de l'anode qui forme un puits. Un puits peut contenir de quelques milliers à plus de 100 000 électrons. La quantité de charge sous chaque pixel est proportionnelle à l'exposition (figure 27).

Chaque pixel mesure entre 4 et 16 µm selon les modèles, et le capteur contient de 512 à 2 048 pixels dans chaque dimension.

C'est fondamentalement le mode de lecture de cette charge qui va différencier les dispositifs CCD et CMOS (figure 28). On peut se reporter à [E 2 530] pour plus de détails sur la technologie.

Dans le CCD, les charges de tout le capteur sont lues séquentiellement. C'est la technologie la plus ancienne, et encore le dispositif le plus sensible. Les charges sont transférées de proche en proche jusqu'au point de lecture.

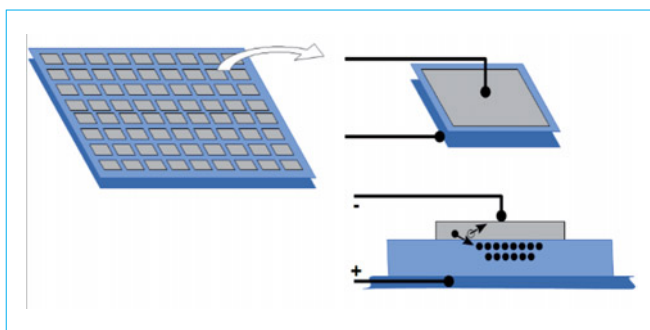


Figure 27 – Schéma d'un point de l'image d'un capteur CMOS : origine de l'accumulation de charges

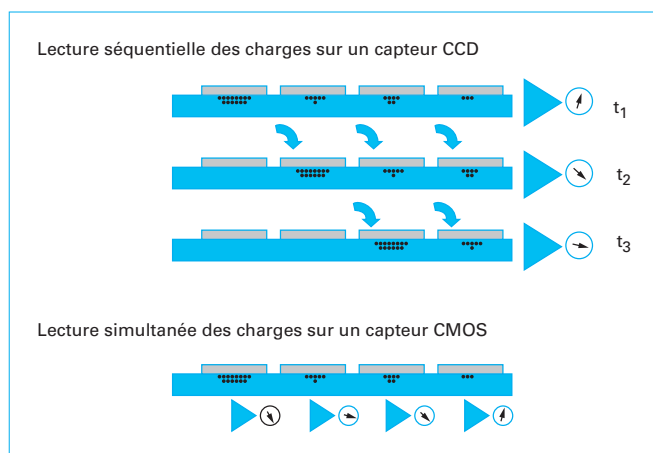


Figure 28 – Lecture des charges sur un capteur CCD et sur un capteur CMOS

Les caméras CMOS disposent d'un circuit de lecture de la charge électrique par pixel. La lecture de plusieurs pixels peut donc s'effectuer simultanément. Initialement utilisées pour les caméras bas de gamme ou pour les applications demandant de la rapidité, les caméras CMOS gagnent en bruit de fond et en sensibilité et concurrencent maintenant les caméras CCD pour l'imagerie de fluorescence.

Globalement, les caméras CCD sont préférées pour leur bas niveau de bruit, les caméras CMOS pour leur vitesse. Des versions particulières, dites sCMOS (*Scientific CMOS*) sont développées pour l'imagerie de fluorescence, qui requiert un bas niveau de bruit et des vitesses le plus élevées possibles.

5.1.1 Méthodes de transfert des charges

Afin de ne pas pénaliser le temps de prise de vue par le temps de lecture du capteur, on transfère les charges par ligne ou sur l'ensemble du capteur dans une zone tampon. Après cette opération, le capteur est de nouveau disponible pour l'exposition, pendant que la lecture des pixels s'effectue dans la zone tampon. Dans les caméras « *interline transfer* », le capteur est composé d'une alternance de colonnes exposées à la lumière et de colonnes tampons. Le transfert se fait du pixel exposé vers le pixel tampon immédiatement voisin. Dans les caméras *frame transfer*, le capteur est constitué de deux zones de même taille dont une est tampon, le transfert se fait par bloc de la zone exposée vers la zone tampon. Dans ces deux architectures, le temps de transfert est de l'ordre de la milliseconde.

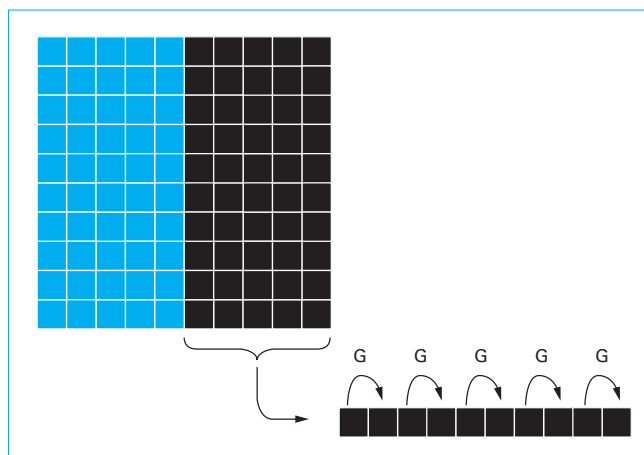


Figure 29 – Schéma d'une caméra à transfert de trame

■ Regroupement local des charges (*binning*)

Afin de minimiser les erreurs de lecture, les caméras CCD, et parfois CMOS aussi, sont dotées d'un dispositif pour additionner les charges des pixels voisins par groupe de 4 (2×2) ou de 16 (4×4). On divise par 4 ou par 16 l'échantillonnage spatial du capteur, mais on augmente très notablement le rapport signal sur bruit (de lecture). Ce mode est très utile quand la réduction du nombre de pixels est acceptable.

■ Amplification des charges pendant les transferts

Dans les caméras les plus sensibles, dites EmCCD (*Electron Multiplying CCD*) les charges traversent une seconde zone de transfert de proche en proche, mais avec une amplification G (de quelques %) à chaque étage (figure 29).

L'amplification finale peut atteindre $\times 1\,000$. Cela revient à diviser le bruit de lecture par ce gain. L'inconvénient est que l'amplification apporte un bruit mathématique. À très bas niveau de lumière, la quantité de charges induite par la source de lumière est du même ordre de grandeur que celle issue du bruit (thermique et d'amplification), ce qui représente un problème majeur en comptage de photons. Leur avantage est leur grande dynamique due à une grande capacité de puits.

5.1.1.1 Autres types de caméras

Les **caméras intensifiées** sont basées sur les dispositifs de vision nocturne. Un intensificateur d'images est formé d'une cathode sensible et d'un réseau de tubes ou canaux, alimentés en haute tension (un ou plusieurs kV) produisant une amplification d'électrons jusqu'à une surface au phosphore qui convertit ces électrons en photons. Plusieurs millions de canaux sont assemblés pour faire une galette amplificatrice de lumière ou MCP (*Micro Channels Plate*). La sortie de l'intensificateur d'image peut être reliée à la caméra par un faisceau de fibres optiques ou par un objectif. Les caméras intensifiées peuvent permettre le comptage de photons.

De nouvelles technologies comme les **capteurs à bombardement d'électrons** (EbCCD ou EbCMOS) sont en développement ou déjà commercialisées. On pourra se reporter à l'article [E 6 570] pour plus de détails. Ce type de capteurs permet le comptage de photons.

5.2 Détecteurs linéaires

Sur les lecteurs automatiques (scanners de lames, de boîtes de culture, etc.), un détecteur linéaire balaie la préparation. Ce détecteur est un CCD ou CMOS formé d'une à quatre lignes de plusieurs

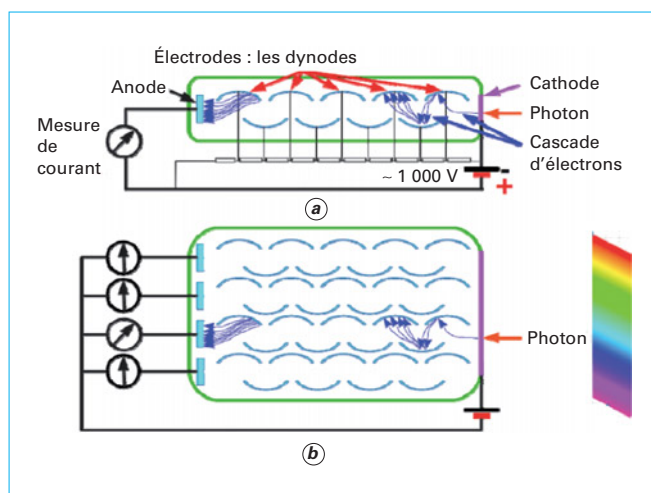


Figure 30 – Schéma de principe d'un photomultiplicateur (PMT) classique (a) et d'un PMT multi-anodes (b). La capture d'un photon sur la cathode produit un électron qui est accéléré puis amplifié par une cascade de dynodes pour fournir un courant sur l'anode. Dans le photomultiplicateur multi-anodes, la position du photon sur la cathode détermine l'anode qui reçoit le courant

milliers de pixels. En microscopie confocale spectrale, les capteurs linéaires sont utilisés pour mesurer la lumière dispersée par un prisme ou un réseau de diffraction. Dans ce cas, on peut aussi construire un détecteur linéaire de 32 photosites avec un photomultiplicateur multi-anodes (figure 30).

5.3 Capteurs ponctuels

Les systèmes de microscope à balayage ne comportent pas de caméra, mais un dispositif de mesure de la lumière « ponctuel » qui ne donne pas d'informations spatiales contrairement à un système matriciel. Le plus utilisé est le tube photomultiplicateur (*Photon Multiplier Tube*, « PMT ») (figure 30a), en particulier la technologie à haut rendement quantique GaAsP. On trouve également des diodes avalanches et des capteurs hybrides (GaAsP + Diode Avalanche). La technologie MCP-PMT (*Micro Channel Plate PMT*) a des temps de réponse de l'ordre de la picoseconde et une sensibilité de l'ordre du photon unique. Ces caractéristiques permettent des applications en mode de comptage de photons et des mesures en temps résolu (voir FLIM dans le paragraphe 5.4).

5.4 Capteurs résolus en temps

Le temps de retour d'une molécule fluorescente à l'état fondamental (quelques ns) constitue une caractéristique au même titre que son spectre d'excitation et son spectre d'émission (§ 1.1). Ce temps est diminué si le retour s'effectue par résonnance de Förster, et sa mesure constitue la meilleure estimation quantitative du FRET. Il est possible de faire une cartographie des durées de vie de fluorescence d'un échantillon, cette technique est appelée FLIM (*Fluorescence Lifetime IMaging*).

Les capteurs résolus en temps pour le FLIM doivent l'être à l'échelle de la nanoseconde ou moins [R 6 732]. Une option consiste à utiliser une caméra intensifiée rapide (de l'ordre de quelques picosecondes) munie d'un dispositif pour intégrer le courant dans une fenêtre temporelle étroite. Une option plus courante consiste à utiliser une caméra à fente (*streak camera*) qui fournit une image de temps de fluorescence sur une ligne, un dispositif mécanique à miroir permettant de balayer successivement toutes

les lignes du champ. L'approche dite TCSPC-FLIM (*Time-Correlated Single Photon Counting FLIM*) utilise un PMT rapide, type MCP-PMT, pour construire un histogramme du nombre de photons détectés en fonction du temps après une impulsion d'excitation ultra-courte (picoseconde) [22]. Par balayage, il est possible de faire la cartographie du temps de fluorescence d'une région.

6. Acteurs industriels de la microscopie à fluorescence

6.1 Structure du secteur

Les principaux constructeurs de microscopes datent d'entre la fin du XIX^e siècle et le début du XX^e sans qu'aucune nouvelle marque n'apparaisse depuis une centaine d'années. Parmi les raisons qui ont limité l'apparition de nouveaux acteurs, on peut citer les investissements très élevés en recherche, développement et production nécessaires, comparés à un volume relativement faible du marché. À titre d'exemple, la division « instruments scientifiques » de la Nikon Corporation au niveau mondial ne représente que 5 % des ventes de la marque, et a généré un revenu d'exploitation négatif les trois dernières années (déficit de 5 milliards de yens en 2013, selon les informations du site Internet de Nikon).

Par ailleurs la nécessité pour les utilisateurs d'avoir un ensemble d'éléments, microscopes caméras et périphériques compatibles entre eux et avec le logiciel de commande, a limité leur nombre (voir le paragraphe 6.5 concernant les logiciels).

En revanche, les processus d'innovation dans ce domaine sont très dynamiques. Le cycle nécessaire entre l'apparition d'un nouveau concept pour améliorer la microscopie dans les laboratoires de recherche et son retour sous forme de produit industriel commercial peut être réduit à deux ou trois ans (figure 31). Dans ce cycle, les nouvelles techniques de microscopie peuvent être issues de centres de recherche et développement des industriels, mais le plus souvent d'une structure académique qui développe un prototype accompagné le cas échéant des publications et des brevets nécessaires.

Une autre possibilité très dynamique est l'intervention d'un constructeur indépendant qui va implémenter la nouvelle technique sur la base d'un microscope de marque existante sous licence « OEM » (intégrateur) et le commercialiser en son nom. On peut citer comme exemples récents de ce type d'innovation la super-résolution en lumière structurée (SIM) ou le microscope à feuille de lumière (SPIM).

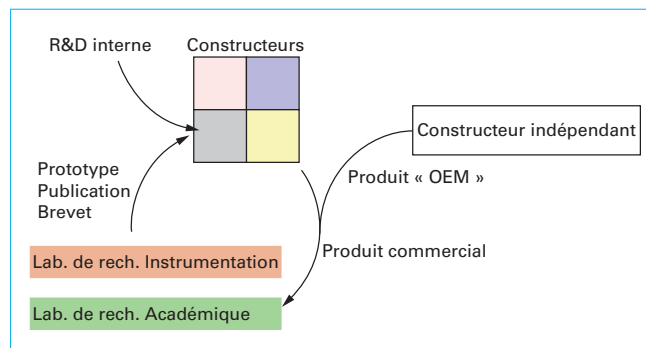


Figure 31 – Schéma des processus de développement technologique pour la microscopie de fluorescence

Ce phénomène a été accéléré par la collaboration entre laboratoires de biologie et d'instrumentation, et l'émergence de plateformes dans les centres de recherche, qui se regroupent en réseaux (réseaux CNRS RTMFM et France Bioimaging pour la France, Eurobioimaging au niveau européen).

6.2 Constructeurs de microscopes

Peu de compagnies se partagent ce secteur sans qu'aucune ne le domine complètement. Pour des applications de niveau recherche, privée, académique ou médicale, quatre entreprises fournissent la quasi-totalité des microscopes : Leica, Nikon, Olympus, et Zeiss. Leica (Leica Microsystems GmbH), issue de la fusion des entreprises Leitz (Allemagne), Cambridge Instruments (Royaume-Uni), Reichert (Autriche) et Wild (Suisse) appartient au fond d'investissement américain Danaher. Nikon fait partie du conglomérat industriel Mitsubishi. Olympus est une entreprise indépendante spécialisée dans l'optique médicale dont l'actionnaire principal est Sony. Zeiss (Carl Zeiss AG) est une entreprise allemande et un des plus anciens fabricants d'optique. Aujourd'hui Zeiss et Schott AG (fabricant des verres) constituent la Fondation Carl Zeiss. Les performances optiques des quatre constructeurs sont assez proches.

6.3 Caméras

Le secteur des caméras nécessaires pour l'acquisition d'images en fluorescence est également occupé par un faible nombre de constructeurs. Ce secteur est plus récent et a vu l'apparition de nouvelles marques importantes depuis une vingtaine d'années. Les principales sont : Andor (Irlande), Hamamatsu (Japon), PCO (Allemagne), Qimaging (Canada), Roper Scientific et Spot (États-Unis). Les constructeurs des capteurs de ces caméras sont moins nombreux (Fairchild, Hamamatsu et Sony).

6.4 Périphériques

L'adaptation des microscopes de fluorescence à la très grande diversité des expérimentations se fait par l'ajout d'éléments périphériques spécifiques, souvent fournis par des entreprises spécialisées. Il s'agit principalement du contrôle de :

- l'environnement de l'échantillon, (systèmes de micro-perfusion, de microfluidique, de chauffage, de contrôle des gaz, etc.) ;
- des sources d'éclairage (systèmes à diodes, filtres, miroirs, obturateurs mécaniques, monochromateurs, lasers, etc.) ;
- des aspects mécaniques (platines et autofocus piézo-électriques, systèmes anti-vibratoires, montages optiques ouverts, etc.).

Ces éléments sont fabriqués par de nombreuses entreprises dont certaines de petite taille.

Exemples : Physik Instrumente (GmbH), Märzhäuser Wetzlar GmbH, Prior Scientific Instruments Ltd (UK), Fluidigm Corp (USA), Linkam Scientific Instruments Ltd. (UK), Harvard Bioscience, Inc. (USA), Okolab Srl (Italie).

6.5 Logiciels

Deux aspects sont nécessaires à l'utilisation de la microscopie de fluorescence, le logiciel de pilotage du matériel et le logiciel d'analyse des images produites.

La prise d'image en microscopie de fluorescence nécessite le contrôle de toutes les fonctions du microscope (éclairage, filtres, etc.), mais aussi la commande de la caméra et de tous les périphériques annexes comme des obturateurs ou autres. Le besoin de traçabilité impose d'enregistrer tous ces paramètres. Le

logiciel ne produit pas seulement des images, mais aussi des métadonnées qui permettent de reproduire au maximum les conditions de leur prise de vue.

Les quatre constructeurs de microscopes proposent des suites logicielles qui pilotent spécifiquement leurs appareils ainsi que des périphériques annexes d'autres marques. Chacun a développé son propre format de données. Le projet collaboratif OME (*Open Microscopy Environment*) propose entre autres des outils « *open source* » permettant de lire les données de l'ensemble des constructeurs.

Indépendamment des constructeurs, d'autres éditeurs de logiciels proposent des produits permettant de piloter microscopes et périphériques (Metamorph[®], UltraView Vox[®], Micro-Manager). Par ailleurs, la plupart de ces appareils peuvent être pilotés par une application développée par l'utilisateur en langage MatLab[®], Lab-View[®], C++, Visual Basic, Python, Java, etc.

Micro-Manager est un projet *open source* qui a l'ambition de fournir un logiciel complet de pilotage de tous les microscopes et périphériques, à partir d'une interface graphique. Il fournit à l'utilisateur une solution gratuite et optimisable en fonction de ces besoins.

L'analyse d'images n'est pas l'objet de cet article. On peut se référer à [P 855]. Les logiciels les plus courants dans ce domaine sont Matlab[®] ou des logiciels libres spécialisés, en particulier ImageJ (et Fiji), Icy, Cell Profiler, Ikt, Knime. Dans la catégorie des logiciels commerciaux, on trouve Amira[®], Imaris[®], Metamorph[®], SVI[®] (Huygens), Volocity[®], etc.

7. Conclusion

Les tissus biologiques sont principalement composés d'eau, et sont transparents. Le développement des méthodes de contraste basées sur le gradient d'indice (contraste de phase, de Nomarski, de Hoffmann) a permis des avancées. L'analyse cytologique ne s'est développée qu'avec les colorants chimiques, puis immuno-chimiques. La microscopie de fluorescence a apporté une révolution en permettant d'observer des structures ciblées sur fond noir. Les sondes de différentes couleurs révèlent leur quantité, leurs positions respectives et leurs interactions. De nouvelles approches permettent d'imager jusqu'à la molécule unique.

On cherche actuellement à coupler la microscopie de fluorescence avec d'autres techniques :

- avec la microscopie électronique pour descendre en résolution au niveau nanométrique ;
- avec des sondes « doubles » pour la RMN ou l'IRM qui permettent de passer à l'échelle de l'organe ou de l'individu en entier [23].

Le développement industriel s'opère dans deux directions opposées. D'une part, des nouveaux appareils faisant appel à des technologies de pointes issues de la recherche (décrites dans les paragraphes précédents), et d'autre part des nouvelles approches de simplification des instruments dans le but d'améliorer leur robustesse, leur capacité à communiquer, leur automatisation, leur autonomie, les possibilités de couplages avec d'autres appareils (téléphone cellulaire par exemple) [7]. Ces nouveaux instruments trouvent des applications originales dans des domaines tels que le télé-diagnostic, les opérations de contrôle en milieu confiné (laboratoires de sécurité biologique P3 ou centrales nucléaires), la recherche en zone tropicale ou sur le terrain, etc. Enfin, de nouveaux développements voient le jour, comme la chirurgie assistée par microscopie de fluorescence qui permet au chirurgien d'observer les cellules tumorales pour une résection complète [24].

Remerciements : ce travail doit beaucoup à l'activité des réseaux nationaux de plate-formes de microscopie optique : RT-MFM et GDR2588.

8. Glossaire – Définitions

Glossaire et source de référence des techniques décrites dans cet article et dans la littérature récente en mai 2014.

4 PI

Imagerie à angle solide de 4π , dans laquelle la préparation est insérée entre deux objectifs utilisés simultanément pour l'excitation à deux photons et le recueil de l'image
doi:10.1364/JOSAA.9.002159

BALM (*Bleaching/Blinking Assisted Localization Microscopy*)

Microscopie de super-résolution identifiant les événements d'allumage et d'extinction spontanée de molécule fluorescente unique par différence entre trames successives
doi:10.1073/pnas.117430109

BiFC (*Bimolecular Fluorescence Complementation*)

Identification d'une réaction par liaison à chacune de deux composants une moitié de fluorophore
doi:10.1146/annurev.biophys.37.032807.125842

BIPLANE

Détermination de la position verticale d'une molécule fluorescente unique entre deux plans
doi:10.1038/nmeth.1211

CW-STED (*Continuous-Wave Sted*)

Microscopie de super-résolution par masquage en émission stimulée, utilisant un laser continu
doi:10.1371/journal.pone.0054421

DH-PSF (*Double-Helix PSF Microscopy*)

Microscopie 3D de molécule unique identifiant la position verticale à l'aide d'une fonction point-source en double hélice
doi:10.1364/BOE.2.003010

dLSM (*Digital scanned Light-Sheet fluorescence Microscopy*)

Microscopie utilisant un feuillet de lumière créé par balayage d'un faisceau fin, permettant l'observation en 3D de préparation épaisse par série d'images obtenues après rotation de la préparation
doi:10.1126/science.1162493

DOPI (*Defocused Orientation and Positional Imaging*)

Voir FIONA doi:10.1101/pdb.top27

dSTORM (*Direct Stochastic Optical Reconstruction Microscopy*)

Microscopie basée sur l'apparition stochastique de molécule unique. Le qualificatif direct, l'oppose à nSTORM basée sur la conjugaison de deux fluorophores
doi:10.1038/nprot.2011.336

FIONA (*Fluorescence Imaging with One-Nanometer Accuracy*)

Famille de techniques de microscopie à l'échelle nanométrique comprenant SHRIMP, SHREC, DOPI, et bFIONA, qui est une variante en microscopie de transmission. La préparation est observée en illumination évanescence (TIRF) la molécule est localisée en effectuant des séries d'images, comme décrit dans le texte pour les techniques de PALM et STORM
doi:10.1101/pdb.top27

FLAP (*Fluorescence Localisation After Photobleaching*)

Technique de microscopie plein-champ pour la localisation de molécule marquée à l'aide de deux fluorophores dont l'un est utilisé pour le blanchiment et l'autre pour le suivi
doi:10.1002/0471143030.cb2102s24

FLIM (*Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy*)

Techniques d'imagerie du temps de réponse d'un fluorophore après une stimulation, usuellement de quelques nanosecondes. Peut être obtenu à l'aide d'impulsions et d'une caméra à fenêtre temporelle, ou par analyse de la réponse d'une stimulation périodique
doi:10.1016/s0962-8924(98)01410-x

FLIP (*Fluorescence Loss In Photobleaching*)

Variante de la technique de FRAP, dans laquelle le blanchiment de la molécule est répété jusqu'à extinction totale de la réserve
doi:10.1242/jcs.01578

FPALM (*Fluorescence Photoactivation Localization Microscopy*)

Microscopie de super-résolution de molécule unique par acquisition d'une grande série d'images en plein-champ, la quantité de fluorophores activés étant contrôlée grâce à l'utilisation de molécule photo-activable (PA-GFP)
doi:10.1529/biophysj.106.091116

FRAP (*Fluorescence Recovering After Photobleaching*)

Technique d'étude de dynamique des protéines en microscopie confocale. Dans une phase initiale, la fluorescence d'une région définie de la préparation est sélectivement photo-blanchie par excitation. L'observation dans cette région permet de déterminer la cinétique et les voies préférentielles de retour de molécules fluorescentes
doi:10.1016/B978-0-12-391857-4.00006-9

FRET (*Förster, ou Fluorescence, Resonance Energy Transfer*)

Imagerie de l'interaction à l'échelle de quelques nanomètres, de deux molécules fluorescentes, un donneur et un accepteur
doi:10.1016/S0006-3495(98)77976-7

GSD (*Ground State Depletion*)

Technique de super-résolution en microscopie à balayage permettant d'observer dans un volume restreint sans limite théorique les molécules fluorescentes après avoir porté les fluorophores voisins dans un état triplet avec le même laser
doi:10.1007/BF01081333

GSDIM (*Ground State Depletion Microscopy Followed By Individual Molecule Return*)

Technique de super-résolution de molécule unique en microscopie plein-champ dans laquelle le contrôle de l'état activable d'un fluorophore est régulé par basculement de l'état de base à un état triplet. Cette technique est sensiblement plus simple que la précédente et s'applique à une large gamme de fluorophores.
doi:10.1038/nmeth.1257

SHRIMP (*Single-molecule-based super resolution images in the presence of multiple fluorophores*)

Microscopie de super-résolution de molécule unique en microscopie plein-champ, dans laquelle le changement d'état d'une molécule unique est identifié par différence entre images successives au sein d'une séquence
doi:10.1021/nl203560r

HROPFOS cf. OPFOS

doi:10.1117/1.2671712

HILO (*Highly Inclined and Laminated Optical Sheet*)

Dispositif d'éclairage du champ du microscope par un pin-céau de lumière obtenu en focalisant un laser à proximité immédiate du plan focal arrière de l'objectif. Il simule une coupe optique horizontale dans les techniques de super-résolution de molécule unique et permet l'observation en 3D dans des conditions proches de l'éclairage évanescence
doi:10.1038/nmeth.1171

ISM

Imagerie de super-résolution à balayage « 5 miroirs » où la préparation est insérée entre deux objectifs de microscope servant à la fois pour l'excitation à deux photons et pour le recueil de l'image
doi:10.1046/j.1365-2818.1999.00576.x

LSFM (*Light Sheet-Based Fluorescence Microscopy*), cf. SPIM

MISERB (*Microscopy With Self-Reconstructing Beams*)

Variante de la microscopie SPIM basée sur l'utilisation de faisceau de Bessel. Cette forme de pinceau de lumière permet l'optimum de résolution, mais possède également des propriétés intéressantes pour la qualité de l'image et la pénétration de la préparation
doi:10.1038/nphoton.2010.204

mSPIM (*Multidirectional Selective Plane Illumination Microscopy*)

Variante de la technique de SPIM utilisant deux objectifs d'éclairage opposés et un objectif d'observation à plus haute ouverture numérique en position orthogonale. L'image est formée par calcul à partir de deux prises de vue par éclairages successifs via chacun des objectifs. Cette technique permet de doubler la résolution axiale du SPIM
doi:10.1364/OL.32.002608

NALMS (*Nanometer-Localized Multiple Single-Molecule Fluorescence Microscopy*)

Microscopie de super-résolution pointilliste en plein-champ, dans laquelle les transitions sont détectées par différence entre trames successives, et la localisation obtenue par calcul de barycentre
doi:10.1073/pnas.0402155101

NASCA (*Nanometer Accuracy By Stochastic Catalytic Reactions*)

doi:10.1002/anie.200904944

nSTORM cf. **dSTORM****OCPI** (*Objective-Coupled Planar Illumination*)

doi:10.1016/j.neuron.2008.01.011

OLID (*Optical Lock-In Detection Imaging*)

doi:10.1073/pnas.0808882105

OPFOS (*Orthogonal Plane Fluorescence Optical Sectioning*)

doi:10.1111/j.1365-2818.1993.tb03346.x

PAINT (*Point Accumulation For Imaging In Nanoscale Tomography*)

doi:10.1073/pnas.0609643104

PALM (*Photoactivated Localization Microscopy*)

Microscopie de super-résolution pointilliste en plein-champ, dans laquelle la préparation est stimulée périodiquement à une longueur d'onde d'activation et les molécules uniques sont identifiées en fluorescence à la longueur d'onde de stimulation, puis s'inactivent par blanchiment
doi:10.1529/biophysj.106.091116

PALMIRA (*PALM with independently running acquisition*)

doi:10.1007/s00340-007-2729-0

RESOLFT (*Reversible Saturable Optical Transitions*)

Ce terme décrit à la fois une application particulière et la dénomination générique des techniques de super-résolution sans limite exploitant la transition entre état fluorescent et non fluorescent d'un fluorophore ou de fluorophores couplés
doi:10.1073/pnas.0604965103

SHREC (*Single-Molecule High-Resolution Colocalization*)

doi:10.1073/pnas.0409487102

SHRIMP (*Single-molecule-based super resolution images in the presence of multiple fluorophores*)

Technique applicable aux préparations statiques
doi:10.1021/nl203560r

SIM (*Structured Illumination Microscopy*)

Technique permettant de doubler la résolution du microscope en analysant une série d'images successives prises sous un éclairage composé de striations sinusoïdales. La période des striations est proche de la limite de résolution, la phase est typiquement décalée de 2π entre deux prises de vue, et une série comporte au moins trois orientations à $2\pi/3$
doi:10.1038/nmeth.1709

smFRET (*Single Molecule FRET*)

Technique de FRET de molécule unique, basée initialement sur des enregistrements cinétiques
doi:10.1038/nsmb831

SOFI (*Super Resolution Optical Fluctuation Imaging*)

doi:10.1073/pnas.0907866106

SPIM (*Selected Plane Illumination Microscopy*)

Microscopie sous éclairage par un pinceau de lumière gaussien perpendiculaire au plan d'observation, dite « microscopie à feuillet de lumière »

SPINDLE (*Super Resolution Photon-Efficient Imaging By Nanometric Double-Helix Point Spread Function Localization Of Emitters*)

Cf. DH-PSF doi:10.1364/OE.20.026681

SSIM (*Saturated Structured Imaging Microscopy*)

Variante de la technique de SIM dans laquelle une stimulation de forte intensité produit une réponse fluorescente non-linéaire, la génération d'harmoniques supérieures étant mise à profit pour obtenir une résolution illimitée en théorie

STED (*STimulated Emission Depletion*)

Technique de microscopie à balayage permettant une super-résolution produisant en un point une stimulation, puis une déplétion par émission stimulée des zones périphériques de la tache d'Airy et ne recueillant que la fluorescence du centre, sans limitation théorique de résolution
doi:10.1002/anie.201100371

STORM (*Stochastic Optical Reconstruction Microscopy*)

Microscopie de super-résolution pointilliste en plein-champ, dans laquelle la préparation est stimulée périodiquement à une longueur d'onde d'activation et les molécules uniques sont identifiées en fluorescence à la longueur d'onde de stimulation, puis s'inactivent par blanchiment. Décrite simultanément au PALM, cette technique portait initialement sur des préparations fixées et utilisait une paire de cyanines conjuguées
doi:10.1038/nmeth929

SWFM (*Standing-Wave Fluorescence Microscopy*)

doi:10.1038/366044a0

TIRF (*Total Internal Reflexion Microscopy*)

Microscopie sous éclairage évanescent, c'est-à-dire oblique à la limite de la réflexion totale. L'onde évanescente ne se propage pas et n'illumine que quelques dizaines de nanomètres de profondeur, en limite de la surface de la lame

TSLIM cf. **SPIM**

doi:10.2144/000113087

Microscopie de fluorescence biomédicale

par **Léon ESPINOSA**

Docteur ès sciences

Ingénieur de recherche CNRS

Responsable du service de microscopie et de criblage du LCB (Laboratoire de Chimie Bactérienne) UMR CNRS 7283 Aix Marseille Université

et **Yves TOURNEUR**

Ingénieur École Centrale de Lyon

Docteur ès sciences, chargé de recherche CNRS, laboratoire INSERM U1060

Responsable de la plate-forme Centre de quantimétrie, Université Claude Bernard Lyon 1

Sources bibliographiques

- [1] MOJZISOVA (H.), BONNEAU (S.) et BRAULT (D.). – *Structural and physico-chemical determinants of the interactions of macrocyclic photosensitizers with cells*. Eur. Biophys. J., vol. 36, n° 8, p. 943-953, nov. 2007.
- [2] VALEUR (B.). – *Molecular fluorescence : principles and applications*. Wiley-VCH, Verlag GmbH, vol. 8 (2001).
- [3] HOLZINGER (M.), LE GOFF (A.) et COSNIER (S.). – *Nanomaterials for biosensing applications : a review*. Front. Chem., vol. 2, p. 1-10, août 2014.
- [4] GIEPMANS (B.N.G.), ADAMS (S.R.), ELLISMAN (M.H.) et TSIEN (R.Y.). – *The fluorescent toolbox for assessing protein location and function*. Science, vol. 312, n° 5771, p. 217-224, avr. 2006.
- [5] SHANER (N.C.), STEINBACH (P.A.) et TSIEN (R.Y.). – *A guide to choosing fluorescent proteins*. Nat. Methods, vol. 2, n° 12, p. 905-909 (2005).
- [6] DUMONT (A.), MALLERON (A.), AWWAD (M.), DUKAN (S.) et VAUZEILLES (B.). – *Click-mediated labeling of bacterial membranes through metabolic modification of the lipopolysaccharide inner core*. Angew. Chem. Int. Ed. Engl., vol. 51, n° 13, p. 3143-3146, mars 2012.
- [7] GÖRÖCS (Z.) et OZCAN (A.). – *On-chip biomedical imaging*. IEEE Rev. Biomed. Eng., vol. 6, n° 7, p. 29-46, janv. 2013.
- [8] KIRSHNER (H.), AGUET (F.), SAGE (D.) et UNSER (M.). – *3D PSF fitting for fluorescence microscopy : implementation and localization application*. J. Microsc., vol. 249, n° 1, p. 13-25, janv. 2013.
- [9] CHUNG (K.) et DEISSEROTH (K.). – *CLARITY for mapping the nervous system*. Nat. Methods, vol. 10, n° 6, p. 508-513, juin 2013.
- [10] KE (M.-T.), FUJIMOTO (S.) et IMAI (T.). – *SeeDB : a simple and morphology-preserving optical clearing agent for neuronal circuit reconstruction*. Nat. Neurosci., vol. 16, n° 8, p. 1154-1161, août 2013.
- [11] GUSTAFSSON (M.G.). – *Surpassing the lateral resolution limit by a factor of two using structured illumination microscopy*. J. Microsc., vol. 198, n° Pt 2, p. 82-87, mai 2000.
- [12] GUSTAFSSON (M.G.L.), AGARD (D.A.) et EDAT (J.W.). – *Short communication I 5M : 3D widefield light microscopy with better than 100 nm axial resolution*. J. Microsc., vol. 195, p. 10-16, juil. 1999.
- [13] WILLIG (K.I.), KELLNER (R.R.), MEDDA (R.), HEIN (B.), JAKOBS (S.) et HELL (S.W.). – *Nanoscale resolution in GFP-based microscopy*. Nat. Methods, vol. 3, n° 9, p. 721-723, sept. 2006.
- [14] VICIDOMINI (G.), SCHÖNLE (A.), TA (H.), HAN (K.Y.), MONERON (G.), EGGELING (C.) et HELL (S.W.). – *STED nanoscopy with time-gated detection : theoretical and experimental aspects*. PLoS One, vol. 8, n° 1, p. e54421, janv. 2013.
- [15] BRETSCHNEIDER (S.), EGGELING (C.) et HELL (S.). – *Breaking the diffraction barrier in fluorescence microscopy by optical shelving*. Phys. Rev. Lett., vol. 98, n° 21, p. 218103, mai 2007.
- [16] TOKUNAGA (M.), IMAMOTO (N.) et SAKATA-SOGAWA (K.). – *Highly inclined thin illumination enables clear single-molecule imaging in cells*. Nat. Methods, vol. 5, n° 2, p. 159-161, fév. 2008.
- [17] VAN DE LINDE (S.), WOLTER (S.), HEILEMANN (M.) et SAUER (M.). – *The effect of photoswitching kinetics and labeling densities on super-resolution fluorescence imaging*. J. Biotechnol., vol. 149, n° 4, p. 260-266, sept. 2010.
- [18] HEILEMANN (M.), VAN DE LINDE (S.), SCHÜTTPELZ (M.), KASPER (R.), SEEFELDT (B.), MUKHERJEE (A.), TINNEFELD (P.) et SAUER (M.). – *Subdiffraction-resolution fluorescence imaging with conventional fluorescent probes*. Angew. Chem. Int. Ed. Engl., vol. 47, n° 33, p. 6172-6176, janv. 2008.
- [19] RUST (M.J.), BATES (M.) et ZHUANG (X.). – *Sub-diffraction-limit imaging by stochastic optical reconstruction microscopy (STORM)*. Nat. Methods, vol. 3, n° 10, p. 793-795, oct. 2006.
- [20] HUANG (B.), WANG (W.), BATES (M.) et ZHUANG (X.). – *Three-dimensional super-resolution imaging by stochastic optical reconstruction microscopy*. Science, vol. 319, n° 5864, p. 810-813, fév. 2008.
- [21] DERTINGER (T.), COLYER (R.), IYER (G.), WEISS (S.) et ENDERLEIN (J.). – *Fast, background-free, 3D super-resolution optical fluctuation imaging (SOFI)*. T. Proc. Natl. Acad. Sci., États-Unis, vol. 106, n° 52, p. 22287-22292 (2009).
- [22] DUNCAN (R.R.), BERGMANN (A.), COUSIN (M.A.), APPS (D.K.) et SHIPSTON (M.J.). – *Multidimensional time-correlated single photon counting (TCSPC) fluorescence lifetime imaging microscopy (FLIM) to detect FRET in cells*. J. Microsc., vol. 215, n° Pt 1, p. 1-12, juil. 2004.
- [23] CHENG (Y.), MORSHED (R.A.), AUFFINGER (B.), TOBIAS (A.L.) et LESNIAK (M.S.). – *Multifunctional nanoparticles for brain tumor imaging and therapy*. Adv. Drug Deliv. Rev., vol. 66, p. 42-57, fév. 2014.
- [24] HUSSAIN (T.) et NGUYEN (Q.T.). – *Molecular imaging for cancer diagnosis and surgery*. Adv. Drug Deliv. Rev., vol. 66, p. 90-100, mars 2014.

Articles de référence : synthèse sur la microscopie et la super-résolution

- LICHTMAN (J.W.) et CONCHELLO (J.). – *Fluorescence microscopy*. Nat. Methods, vol. 2, n° 12, p. 910-919, déc. 2005.
- ZIMMERMANN (T.), RIETDORF (J.) et PEPPERKOK (R.). – *Spectral imaging and its applications in live cell microscopy*. FEBS Lett., vol. 546, n° 1, p. 87-92, 2003.
- Handbook of biological confocal microscopy. Springer, p. 988 (2006).
- AMOS (W.B.) et WHITE (J.G.). – *How the confocal laser scanning microscope entered biological research*. Biol. Cell, vol. 95, n° 6, p. 335-342, sept. 2003.
- STELTZER (E.H.). – *Contrast, resolution, pixelation, dynamic range and signal-to-noise ratio : fundamental limits to resolution in fluorescence light microscopy*. J. Microsc., vol. 189, p. 15-24, janv. 1998.

- ANDRESEN (V.), ALEXANDER (S.), HEUPEL (W.-M.), HIRSCHBERG (M.), HOFFMAN (R.M.) et FRIEDL (P.). – *Infrared multiphoton microscopy: subcellular-resolved deep tissue imaging*. Curr. Opin. Biotechnol., vol. 20, n° 1, p. 54-62 (2009).
- WALTER (T.), SHATTUCK (D.W.), BALDOCK (R.), BASTIN (M.E.), CARPENTER (A.E.), DUCE (S.), ELLENBERG (J.), FRASER (A.), HAMILTON (N.), PIEPER (S.), RAGAN (M.A.), SCHNEIDER (J.E.), TOMANCAK (P.) et HÉRICHÉ (J.). – *Visualization of image data from cells to organisms*. Vol. 7, n° 3 (2010).
- HEILEMANN (M.). – *Fluorescence microscopy beyond the diffraction limit*. J. Biotechnol., vol. 149, n° 4, p. 243-251, sept. 2010.
- ISHIKAWA-ANKERHOLD (H.C.), ANKERHOLD (R.) et DRUMMEN (G.P.C.). – *Advanced fluorescence microscopy techniques – FRAP, FLIP, FLAP, FRET and FLIM*. Molecules, vol. 17, n° 4, p. 4047-4132, janv. 2012.
- MIN (W.), FREUDIGER (C.W.), LU (S.) et XIE (X.S.). – *Coherent nonlinear optical imaging: beyond fluorescence microscopy*. Annu. Rev. Phys. Chem., vol. 62, p. 507-530, janv. 2011.
- KHERLOPIAN (A.R.), SONG (T.), DUAN (Q.), NEIMARK (M.A.), PO (M.J.), GOHAGAN (J.K.) et LAINE (A.F.). – *A review of imaging techniques for systems biology*. BMC Syst. Biol., vol. 2, p. 74 (2008).
- GARINI (Y.), VERMOLEN (B.J.) et YOUNG (I.T.). – *From micro to nano: recent advances in high-resolution microscopy*. Curr. Opin. Biotechnol., vol. 16, n° 1, p. 3-12, mars 2005.
- HELL (S.W.), DYBA (M.) et JAKOBS (S.). – *Concepts for nanoscale resolution in fluorescence microscopy*. Curr. Opin. Neurobiol., vol. 14, n° 5, p. 599-609, oct. 2004.
- HELL (S.W.). – *Toward fluorescence nanoscopy*. Nat. Biotechnol., vol. 21, n° 11, p. 1347-1355, nov. 2003.
- SWEDLOW (J.R.). – *Innovation in biological microscopy: current status and future directions*. Bioessays, vol. 34, n° 5, p. 333-340, mai 2012.
- HELL (S.W.). – *Far-field optical nanoscopy*. Science, vol. 316, n° 5828, p. 1153-1158, mai 2007.
- DICKINSON (M.E.), BEARMAN (G.), TILLE (S.), LANSFORD (R.) et SE. – *Multi-spectral imaging and linear unmixing add a whole new dimension to laser scanning fluorescence microscopy*. Biotechniques, vol. 31, n° 6, p. 1272, 1274-1276, 1278 (2001).
- COELHO (M.), MAGHELLI (N.) et TOLIAC-NØRRELYKKE (I.M.). – *Single-molecule imaging in vivo: the dancing building blocks of the cell*. Integr. Biol. (Camb), vol. 5, n° 5, p. 748-758, mai 2013.
- TOOMRE (D.) et BEWERSDORF (J.). – *A new wave of cellular imaging*. Annu. Rev. Cell. Dev. Biol., vol. 26, p. 285-314, janv. 2010.

Articles de référence : les fluorophores

- McKINNEY (S.A.), MURPHY (C.S.), HAZELWOOD (K.L.), DAVIDSON (M.W.) et LOOGER (L.L.). – *A bright and photostable photoconvertible fluorescent protein*. Vol. 6, n° 2, p. 131-133 (2009).
- VOGELSANG (J.), CORDES (T.), FORTHMANN (C.), STEINHÄUER (C.) et TINNEFELD (P.). – *Intrinsically resolution enhancing probes for confocal microscopy*. Nano Lett., vol. 10, n° 2, p. 672-679, fév. 2010.
- FERNÁNDEZ-SUÁREZ (M.) et TING (A.Y.). – *Fluorescent probes for super-resolution imaging in living cells*. Nat. Rev. Mol. Cell. Biol., vol. 9, n° 12, p. 929-943, déc. 2008.
- BOURGOIS (D.) et ADAM (V.). – *Reversible photo switching in fluorescent proteins : a mechanis-*

tic view. IUBMB Life, vol. 64, n° 6, p. 482-491, juin 2012.

- CHEKI (M.), MOSLEHI (M.) et ASSADI (M.). – *Marvelous applications of quantum dots*. Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci., vol. 17, n° 9, p. 1141-1148, mai 2013.
- STEINHÄUER (C.), FORTHMANN (C.), VOGELSANG (J.) et TINNEFELD (P.). – *Super-resolution microscopy on the basis of engineered dark states*. J. Am. Chem. Soc., vol. 130, n° 50, p. 16840-16841, déc. 2008.
- VAN DE LINDE (S.), WOLTER (S.), HEILEMANN (M.) et SAUER (M.). – *The effect of photoswitching kinetics and labeling densities on super-resolution fluorescence imaging*. J. Biotechnol., vol. 149, n° 4, p. 260-266, sept. 2010.

Articles de référence : utilisation de la résonance de Förster (FRET)

- WALLRABE (H.) et PERIASAMY (A.). – *Imaging protein molecules using FRET and FLIM microscopy*. Current Opinion in Biotechnology, vol. 16, n° 1 SPEC. ISS, p. 19-27 (2005).
- GORDON (G.W.), BERRY (G.), LIANG (X.H.), LEVINE (B.) et HERMAN (B.). – *Quantitative fluorescence resonance energy transfer measurements using fluorescence microscopy*. Biophys. J., vol. 74, n° 5, p. 2702-2713, mai 1998.

Articles de référence : microscopie à deux objectifs I5M, 4 Pi

- BEWERSDORF (J.), SCHMIDT (R.) et HELL (S.W.). – *Comparison of I5M and 4Pi-microscopy*. J. Microsc., vol. 222, n° Pt 2, p. 105-117, mai 2006.
- EGNER (A.) et HELL (S.W.). – *Fluorescence microscopy with super-resolved optical sections*. Trends Cell Biol., vol. 15, n° 4, p. 207-215 (2005).
- HELL (S.) et STELZER (E.H.K.). – *Properties of a 4Pi confocal fluorescence microscope*. J. Opt. Soc. Am. A, vol. 9, n° 12, p. 2159.

Articles de référence : microscopie à évanesence et durée de vie de fluorescence (TIRF, FLIM)

- MARTIN-FERNANDEZ (M.L.), TYNAN (C.J.) et WEBB (S.E.D.). – *A « pocket guide » to total internal reflection fluorescence*. J. Microsc., vol. 252, n° 1, p. 16-22, oct. 2013.
- THOMPSON (N.L.) et STEELE (B.L.). – *Total internal reflection with fluorescence correlation spectroscopy*. Nat. Protoc., vol. 2, n° 4, p. 878-890, janv. 2007.
- BASTIAENS (P.I.) et SQUIRE (A.). – *Fluorescence lifetime imaging microscopy : spatial resolution of biochemical processes in the cell*. Trends Cell Biol., vol. 9, n° 2, p. 48-52, fév. 1999.
- FUNATSU (T.), HARADA (Y.), TOKUNAGA (M.), SAITO (K.) et YANAGIDA (T.). – *Imaging of single fluorescent molecules and individual ATP turnovers by single myosin molecules in aqueous solution*. Nature (1995).

Articles de référence : microscopie à illumination structure (SIM, SSIM)

- REGO (E.H.), SHAO (L.), MACKLIN (J.J.), WINOTO (L.), JOHANSSON (G.A.), KAMPS-HUGHES (N.), DAVIDSON (M.W.) et GUSTAFSSON (M.G.L.). – *Nonlinear structured-illumination microscopy with a photoswitchable protein reveals cellular structures at 50 nm resolution*. Proc. Natl. Acad. Sci., États-Unis, vol. 109, n° 3, p. E135-143, janv. 2012.
- FIOŁKA (R.), SHAO (L.), REGO (E.H.), DAVIDSON (M.W.) et GUSTAFSSON (M.G.L.). – *Time-lapse two-color 3D imaging of live cells with doubled resolution using structured illumination*. Proc.

Natl. Acad. Sci., États-Unis, vol. 109, n° 14, p. 5311-5315, avr. 2012.

Articles de référence : étude de molécule unique (PALM, STORM)

- BETZIG (E.), PATTERSON (G.H.), SOUGRAT (R.), LINDWASSER (O.W.), OLENYCH (S.), BONIFACINO (J.S.), DAVIDSON (M.W.), LIPPINCOTT-SCHWARTZ (J.) et HESS (H.F.). – *Imaging intracellular fluorescent proteins at nanometer resolution*. Science, vol. 313, n° 5793, p. 1642-1645, sept. 2006.
- SENGUPTA (P.) et LIPPINCOTT-SCHWARTZ (J.). – *Quantitative analysis of photoactivated localization microscopy (PALM) datasets using pair-correlation analysis*. Bioessays, vol. 34, n° 5, p. 396-405, mai 2012.
- BURNETTE (D.T.), SENGUPTA (P.), DAI (Y.), LIPPINCOTT-SCHWARTZ (J.) et KACHAR (B.). – *Bleaching/blinking assisted localization microscopy for super-resolution imaging using standard fluorescent molecules*. Proc. Natl. Acad. Sci., États-Unis, vol. 108, n° 52, p. 21081-21086, déc. 2011.
- SHROFF (H.), GALBRAITH (C.G.), GALBRAITH (J.A.) et BETZIG (E.). – *Live-cell photoactivated localization microscopy of nanoscale adhesion dynamics*. Nat. Methods, vol. 5, n° 5, p. 417-423, mai 2008.
- SHERMAN (E.), BARR (V.A.) et SAMELSON (L.E.). – *Resolving multi-molecular protein interactions by photoactivated localization microscopy*. Methods, vol. 59, n° 3, p. 261-269, mars 2013.
- BATES (M.), JONES (S.A.) et ZHUANG (X.). – *Stochastic optical reconstruction microscopy (STORM) : a method for super-resolution fluorescence imaging*. Cold Spring Harb. Protoc., vol. 2013, n° 6, p. 498-520, juin 2013.
- JUETTE (M.F.), GOULD (T.J.), LESSARD (M.D.), MŁODZIANOSKI (M.J.), NAGPURE (B.S.), BENNETT (B.T.), HESS (S.T.) et BEWERSDORF (J.). – *Three-dimensional sub-100 nm resolution fluorescence microscopy of thick samples*. Nat. Methods, vol. 5, n° 6, p. 527-529, juin 2008.
- VAN DE LINDE (S.), LÖSCHBERGER (A.), KLEIN (T.), HEIDBREDER (M.), WOLTER (S.), HEILEMANN (M.) et SAUER (M.). – *Direct stochastic optical reconstruction microscopy with standard fluorescent probes*. Nat. Protoc., vol. 6, n° 7, p. 991-1009, juil. 2011.
- LAMPE (A.), HAUCKE (V.), SIGRIST (S.J.), HEILEMANN (M.) et SCHMORANZER (J.). – *Multicolour direct STORM with red emitting carboxyanines*. Biol. Cell., vol. 104, n° 4, p. 229-237, avr. 2012.
- BURNETTE (D.T.), SENGUPTA (P.) et HELL (S.W.). – *Strategy for far-field optical imaging and writing without diffraction limit*. Phys. Lett. A, vol. 326, n° 1-2, p. 140-145, mai 2004.
- HESS (S.T.), GIRIRAJAN (T.P.K.) et MASON (M.D.). – *Ultra-high resolution imaging by fluorescence photoactivation localization microscopy*. Biophys. J., vol. 91, n° 11, p. 4258-4272, déc. 2006.
- BATES (M.), HUANG (B.), DEMPSEY (G.T.) et ZHUANG (X.). – *Multicolor super-resolution imaging with photo-switchable fluorescent probes*. Science, vol. 317, n° 5845, p. 1749-1753, sept. 2007.
- OLIVIER (N.), KELLER (D.), RAJAN (V.S.), GÖNCZY (P.) et MANLEY (S.). – *Simple buffers for 3D Storm microscopy*. Biomed. Opt. Express, vol. 4, n° 6, p. 885-899, juin 2013.
- GROVER (G.), DELUCA (K.), QUIRIN (S.), DeLUCA (J.) et PIESTUN (R.). – *Super-resolution photon-efficient imaging by nanometric double-helix point spread function localization of emitters (SPINDLE)*. Opt. Express., vol. 20, n° 24, p. 26681-26695, nov. 2012.

- BROWN (T.A.), TKACHUK (A.N.), SHTENGEL (G.), KOPEK (B.G.), BOGENHAGEN (D.F.), HESS (H.F.) et CLAYTON (D.A.). – *Super-resolution fluorescence imaging of mitochondrial nucleoids reveals their spatial range, limits, and membrane interaction*. Mol. Cell. Biol., vol. 31, n° 24, p. 4994-5010, déc. 2011.
- WOLTER (S.), SCHÜTTPELZ (M.), TSCHEREPANOW (M.), VAN DE LINDE (S.), HEILEMANN (M.) et SAUER (M.). – *Real-time computation of subdiffraction-resolution fluorescence images*. J. Microsc., vol. 237, n° 1, p. 12-22, janv. 2010.
- XU (K.), BABCOCK (H.P.) et ZHUANG (X.). – *Dual-objective storm reveals three-dimensional filament organization in the actin cytoskeleton*. Nat. Methods, vol. 9, n° 2, p. 185-188, fév. 2012.
- PAVANI (S.R.P.), THOMPSON (M.A.), BITEEN (J.S.), LORD (S.J.), LIU (N.), TWIEG (R.J.), PIESTUN (R.) et MOERNER (W. E.). – *Three-dimensional, single-molecule fluorescence imaging beyond the diffraction limit by using a double-helix point spread function*. Proc. Natl. Acad. Sci., États-Unis, vol. 106, n° 9, p. 2995-2999, mars 2009.
- BADIEIROSTAMI (M.), LEW (M.D.), THOMPSON (M.A.) et MOERNER (W.E.). – *Three-dimensional localization precision of the double-helix point spread function versus astigmatism and biplane*. Appl. Phys. Lett., vol. 97, n° 16, p. 161103, oct. 2010.

Articles de référence : microscopie Resolft, et masquage par beignet de lumière STED, GSD

- BEWERSDORF (R.G.), SCHWENTKER (M.A.), BOCK (H.), HOFMANN (M.), JAKOBS (S.), EGGELING (C.) et HELL (S.W.). – *Wide-field subdiffraction RESOLFT microscopy using fluorescence protein photoswitching*. Vol. 280, n° décembre 2006, p. 269-280 (2007).
- HELL (S.W.) et WICHMANN (J.). – *Breaking the diffraction resolution limit by stimulated emission : stimulated-emission-depletion fluorescence microscopy*. Opt. Lett., vol. 19, n° 11, p. 780, juin 1994.
- HOFMANN (M.), EGGELING (C.), JAKOBS (S.) et HELL (S.W.). – *Breaking the diffraction barrier in fluorescence microscopy at low light intensities by using reversibly photoswitchable proteins*. Proc. Natl. Acad. Sci., États-Unis, vol. 102, n° 49, p. 17565-17569, déc. 2005.
- BADDELEY (D.), JAYASINGHE (I.D.), CREMER (C.), CANNELL (M.B.) et SOELLER (C.). – *Light-induced dark states of organic fluochromes enable 30 nm resolution imaging in standard media*. Biophys. J., vol. 96, n° 2, p. L22-L24, janv. 2009.
- KLAR (T.A.), JAKOBS (S.), DYBA (M.), EGNER (A.) et HELL (S.W.). – *Fluorescence microscopy with diffraction resolution barrier broken by stimulated emission*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 97(15), p 8206-8210 (2000).

- WILLIG (K.I.), KELLER (J.), BOSSI (M.) et HELL (S.W.). – *STED microscopy resolves nanoparticle assemblies*. New J. Phys., vol. 8, n° 6, p. 106, juin 2006.
- FÖLLING (J.), BOSSI (M.), BOCK (H.), MEDDA (R.), WURM (C.A.), HEIN (B.), JAKOBS (S.), EGGELING (C.) et HELL (S.W.). – *Fluorescence nanoscopy by ground-state depletion and single-molecule return*. Vol. 5, n° 11, p. 943-945 (2008).
- RITTWEGER (E.), HAN (K.Y.), IRVINE (S.E.), EGGELING (C.) et HELL (S.W.). – *STED microscopy reveals crystal colour centres with nanometric resolution*. p. 1-4, fév. 2009.
- HAN (K.Y.), KIM (S.K.), EGGELING (C.) et HELL (S.W.). – *Metastable dark states enable ground state depletion microscopy of nitrogen vacancy centers in diamond with diffraction-unlimited resolution*. NanoLett., vol. 10, n° 8, p. 3199-3203, août 2010.
- HELL (S.W.), JAKOBS (S.) et KASTRUP (L.). – *Imaging and writing at the nanoscale with focused visible light through saturable optical transitions*. Appl. Phys. A, Mater. Sci. Process., vol. 77, n° 7, p. 859-860, déc. 2003.
- WILDANGER (D.), PATTON (B.R.), SCHILL (H.), MARSEGLIA (L.), HADDEN (J.P.), KNAUER (S.), SCHÖNLE (A.), RARITY (J.G.), O'BRIEN (J.L.), HELL (S.W.) et SMITH (J.M.). – *Solid immersion facilitates fluorescence microscopy with nanometer resolution and sub-ångström emitter localization*. Adv. Mater., vol. 24, n° 44, p. OP309-OP313, nov. 2012.

Articles de référence : super-résolution par calcul (SOFI)

- DEDECKER (P.), MO (G.C.H.), DERTINGER (T.) et ZHANG (J.). – *Widely accessible method for super-resolution fluorescence imaging of living systems*. Proc. Natl. Acad. Sci., États-Unis, vol. 109, n° 27, p. 10909-10914, juil. 2012.

Articles de référence : microscopie à feuillet de lumière (SPIM)

- HOLEKAMP (T.F.), TURAGA (D.) et HOLY (T.E.). – *Fast three-dimensional fluorescence imaging of activity in neural populations by objective-coupled planar illumination microscopy*. Neuron, vol. 57, n° 5, p. 661-672, mars 2008.
- PLANCHON (T.A.), GAO (L.), MILKIE (D.E.), DAVIDSON (M.W.), GALBRAITH (J.A.), GALBRAITH (C.G.) et BETZIG (E.). – *Rapid three-dimensional isotropic imaging of living cells using Bessel beam plane illumination*. Vol. 8, n° 5 (2011).
- PURNAPATRA (S.B.), BERA (S.) et MONDAL (P.P.). – *Spatial filter based Bessel-like beam for improved penetration depth imaging in fluorescence microscopy*. Sci. Rep., vol. 2, p. 692, janv. 2012.
- VERVEER (P.J.), SWOGER (J.), PAMPALONI (F.), GREGER (K.), MARCELLO (M.) et STELZER (E.H.K.). – *Dimensional imaging of large specimens with light sheet – based microscopy*. Vol. 4, n° 4, p. 311-313 (2007).

mens with light sheet – based microscopy. Vol. 4, n° 4, p. 311-313 (2007).

- MAY (B.M.). – *Fluorescence microscopy/cell biology : the planar truth about light-sheet microscopy*. BioOptics, n° 1, p. 5-9 (2014).
- HUISKEN (J.), SWOGER (J.), DEL BENE (F.), WITTBRODT (J.) et STELZER (E.H.K.). – *Optical sectioning deep inside live embryos by selective plane illumination microscopy*. Science, vol. 305, n° 5686, p. 1007-1009, août 2004.
- WEBER (M.) et HUISKEN (J.). – *Light sheet microscopy for real-time developmental biology*. Curr. Opin. Genet. Dev., vol. 21, n° 5, p. 566-572, oct. 2011.

Articles de référence : logiciels

- COLLINS (T.J.). – *ImageJ for microscopy*. Biotechniques, vol. 43, n° 1 suppl., p. 25-30 (2007).
- SHEFFIELD (J.). – *ImageJ, an useful tool for biological image processing and analysis*. Microsc. Microanal., vol. 13, n° S02, p. 898-899 (2007).
- GALLAGHER (S.R.). – *Digital Image processing and analysis with imageJ*. Curr. Protoc. Essent. Lab. Tech., p. 1-24 (2010).
- DEDECKER (P.), DUWÉ (S.), NEELY (R.K.) et ZHANG (J.). – *Localizer : fast, accurate, open-source, and modular software package for super-resolution microscopy*. J. Biomed. Opt., vol. 17, n° 12, p. 126008, déc. 2012.
- WEI (N.), FLASCHEL (E.), FRIEHS (K.) et NATTKEMPER (T.W.). – *A machine vision system for automated non-invasive assessment of cell viability via dark field microscopy, wavelet feature selection and classification*. BMC Bioinformatics, vol. 9, p. 449, janv. 2008.
- GRIFFA (D.), GARIN (A.) et SAGE (N.). – *Comparison of deconvolution software in 3D microscopy : an user point of view – Part 1*. GIT Imaging Microsc., vol. 12, n° 1, p. 43-45 (2010).

Articles de référence : étude de tissus épais, techniques de transparence (clearing)

- O'MALLEY (D.). – *Chapter 5 : imaging in depth : controversies and opportunities*. Methods Cell. Biol., vol. 89, n° 08, p. 95-128, janv. 2008.
- CHEONG (W.F.), PRAHL (S.A.S.) et WELCH (A.J.A.). – *A review of the optical properties of biological tissues*. IEEE J. Quantum Electron., vol. 26, n° 12, p. 2166-2185 (1990).
- SAKHALKAR (H.S.), DEWHIRST (M.), OLIVER (T.), CAO (Y.) et OLDHAM (M.). – *Functional imaging in bulk tissue specimens using optical emission tomography : fluorescence preservation during optical clearing*. Phys. Med. Biol., vol. 52, n° 8, p. 2035-2054, avr. 2007.
- HUISKEN (J.), SWOGER (J.), DEL BENE (F.), WITTBRODT (J.) et STELZER (E.H.K.). – *Optical sectioning deep inside live embryos by selective plane illumination microscopy*. Science, vol. 305, n° 5686, p. 1007-1009, août 2004.

À lire également dans nos bases

- ANTON LEBERRE (V.). – *Biopuces : applications et devenir*. [BIO 7 150] Analyse et mesure en biotechnologie (2013).
- BOUCHARLAT (G.). – *Dispositifs à transfert de charges (CCD)*. [E 2 530] Électronique analogique (2006).
- GIDRO (X.), BAGHDOYAN (S.) et ROUPIOZ (Y.). – *Les biopuces*. [RE 17] Bioprocédés (2004).
- MAUCHIEN (P.). – *Spectrofluorimétrie moléculaire et spectrométrie de fluorescence atomique*.

[P 2 835] Techniques d'analyse (Archives) (1990).

- MIDAVAINÉ (T.). – *Imagerie à bas niveau de lumière – Fondamentaux et perspectives*. [E 6 570] Composants optoélectroniques (2012).
- PETIT (A.). – *Théorie des spectres atomiques*. [P 2 655] Fondamentaux de l'optique (1999).
- PRENEL (J.-P.). – *Physique du laser*. [AF 3 270] Sources laser (1999).

ROBLIN (G.). – *Microscopie*. [R 6 710] Métrologie optique et photonique (1998).

- ROBLIN (G.). – *Microscopie optique*. [R 6 712] Métrologie optique et photonique (1999).
- ROBLIN (G.). – *Microscopies optiques à balayage*. [R 6 714] Métrologie optique et photonique (1999).
- SOUCHIER (C.). – *Analyse d'images*. [P 855] Techniques d'analyse par imagerie (1998).

Outils logiciels

Saisie d'image et pilotage des périphériques

Metamorph
<http://www.moleculardevices.com-Products/Software/Meta-Imaging-Series/MetaMorph.html>

Pilotage des périphériques

Micro-manager
<https://www.micro-manager.org/>

Traitement et analyse d'images

De nombreux logiciels libres sont disponibles pour le traitement d'images. Depuis le congrès IEEE de Barcelone en juin 2012, les éditeurs travaillent à leur interopérabilité

imageJ
<http://www.imagej.nih.gov/ij/>

Fiji, autre distribution de imageJ, et ImgLib2
<http://www.fiji.sc/Fiji>
<http://www.fiji.sc/wiki/index.php/ImgLib2>

Icy
<http://www icy.bioimageanalysis.org/>

Cell profiler et Cell profiler analyst
<http://www.cellprofiler.org/>

Projet OME (Open Microscopy Environment) conversion de format et archivage de fichiers
<https://www.openmicroscopy.org/>

BioimageXD
<http://www.bioimagexd.net/>

Knime
<http://www.tech.knime.org/community/image-processing>

OpenCV
<http://www.opencv.org/>

Sites Internet

On trouvera une quantité d'informations à propos de la microscopie sur le site édité par l'Université Fédérale de Floride
<http://www.micro.magnet.fsu.edu/>

Articles historiques et de synthèse sur la microscopie optique du journal Nature
<http://www.nature.com/milestones/light-microscopy>

Sites didactiques des constructeurs de microscopes (consulté le 23 avril 2014) :

Leica
<http://www.leica-microsystems.com/science-lab/>

Nikon
<http://www.microscopyu.com/tutorials/>

Olympus
<http://www.olympusmicro.com/>

Zeiss
<http://www.zeiss-campus.magnet.fsu.edu/index.html>

Sites académiques et institutionnels (consultés le 12 mai 2014) :

Groupe de Recherche CNRS « Microscopie Fonctionnelle du Vivant »
<http://www.gdr2588.cnrs.fr>

RT-MFM (Microscopie Photonique de Fluorescence Multidimensionnelle)
<http://www.rtmfm.cnrs.fr>

Réseau France-Biolmaging
<http://www.france-biolmaging.org>

Réseau Européen Euro-Biolmaging
<http://www.eurobiolmaging.eu>

Site de l'université du Maine
<http://www.optique-ingenieur.org>

SSIM (Saturated Structured Imaging Microscopy)
<http://www.microscopyu.com/articles/superresolution/stormintro.html>

TIRF (Total Internal Reflexion Microscopy)
<http://www.microscopyu.com/articles/superresolution/stormintro.html>

Événements

École thématique de microscopie fonctionnelle en biologie
<http://www.mifobio.fr/>

Annuaire

Constructeurs – Microscopes (liste non exhaustive)

Leica
<http://www.leica-microsystems.com/>

Nikon
<http://www.nikoninstruments.com/>

Olympus
<http://www.olympusmicro.com/>

Zeiss
<http://www.zeiss.com/>

Constructeurs – Caméras (liste non exhaustive)

Andor
<http://www.andor.com>

Fairchild Imaging
<http://www.fairchildimaging.com/>

Foveon
<http://www.foveon.com>

Hamamatsu
<http://www.hamamatsu.com/>

Jenoptik
<http://www.jenoptik.com/>

JAI
<http://www.jai.com/>

Nüvü
<http://www.nuvucameras.com/>

PCO
<http://www.pco.de/>

Perkin Elmer
<http://www.perkinelmer.com/pages/020/cellularimaging/products/ultraviewvxo.xhtml>

Photometrics
<http://www.photometrics.com/products/emccdcams/quantem.php>

Princeton Instruments
<http://www.princetoninstruments.com>

Sony
<http://www.sony.net/>

Thorlabs
<http://www.thorlabs.com/>

Gagnez du temps et sécurisez vos projets en utilisant une source actualisée et fiable !

15 DOMAINES D'EXPERTISE

- ✓ Automatique - Robotique
- ✓ Biomédical - Pharma
- ✓ Construction et travaux publics
- ✓ Électronique - Photonique
- ✓ Énergies
- ✓ Environnement - Sécurité
- ✓ Génie industriel
- ✓ Ingénierie des transports
- ✓ Innovation
- ✓ Matériaux
- ✓ Mécanique
- ✓ Mesures - Analyses
- ✓ Procédés chimie - bio - agro
- ✓ Sciences fondamentales
- ✓ Technologies de l'information



Articles de référence
disponibles en français
et en anglais

Détails des offres et sommaires
à retrouver sur le site

www.techniques-ingenieur.fr

Les offres Techniques de l'Ingénieur permettent d'accéder à une **base complète et actualisée d'articles** rédigés par les meilleurs experts et validés par des comités scientifiques, avec :

+ de 10 000 articles de référence et 1 000 fiches pratiques opérationnelles.

3 000 quiz dans + de 1 000 articles interactifs.

+ de 550 bases documentaires, 8 Parcours Pratiques répartis dans plus de 90 offres.

1 280 auteurs contribuent chaque année à enrichir cette ressource.

Service de Questions aux experts.

Les Archives, technologies anciennes et versions antérieures des articles.

+ de 300 000 utilisateurs de techniques-ingenieur.fr chaque mois !

NOS ÉQUIPES SONT
À VOTRE DISPOSITION

Par téléphone
 33 (0)1 53 35 20 20

Par email
 infos.clients@teching.com