

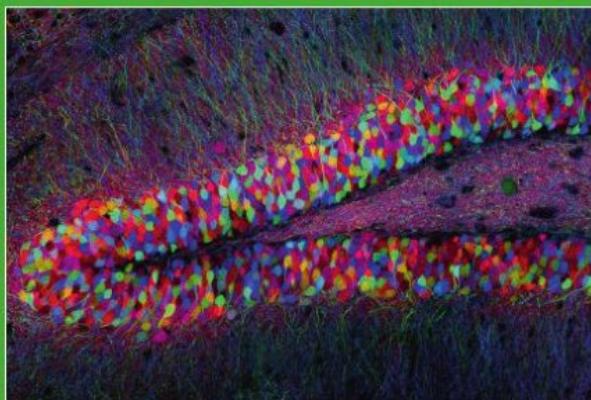
SAVOIRS

PHYSIQUE

ACTUELS

IMAGER L'INVISIBLE AVEC LA LUMIÈRE

COMMENT L'OPTIQUE
MODERNE RÉVOLUTIONNE
L'IMAGERIE DU VIVANT



SYLVAIN GIGAN
ET CATHIE VENTALON,
COORD.

CNRS EDITIONS



edp sciences

Chapitre 5

Microscopie de Fluorescence

Cathie Ventalon

Introduction

Depuis son invention au XVII^e siècle, la microscopie optique a constitué un domaine de recherche important, avec de multiples innovations qui font de cette technique un outil précieux pour les biologistes. En particulier, l'un des enjeux a été d'améliorer le contraste des images pour faire ressortir les objets d'intérêt (le signal) par rapport à leur environnement (le fond). L'utilisation de la fluorescence a représenté une avancée déterminante, parce qu'elle permet de marquer les objets que l'on souhaite observer, qui apparaissent alors lumineux sur un fond sombre. Depuis quelques dizaines d'années, des chercheurs en biochimie et en génétique ont inventé des moyens de rendre fluorescents quasiment chacun des éléments des systèmes biologiques, de manière spécifique. C'est ainsi que la microscopie de fluorescence est devenu un outil incontournable de la biologie.

L'objectif de ce chapitre est de décrire les principales méthodes d'imagerie de fluorescence, en partant des techniques les plus simples jusqu'aux plus sophistiquées nées il y a quelques années seulement. Nous nous intéresserons plus particulièrement aux dispositifs qui permettent de visualiser des cellules au sein d'animaux vivants, tels que des insectes, des poissons, ou même des rongeurs (rats, souris). Dans ce cadre, la microscopie de fluorescence a deux types d'applications. Elle permet d'une part de réaliser une imagerie morphologique du tissu biologique, c'est-à-dire d'étudier l'anatomie et l'organisation des cellules au sein d'organismes complexes. Ceci a par exemple de nombreuses applications en biologie du développement, où on peut observer la migration des cellules au cours de la maturation des embryons, mais également en neurosciences, où on peut observer les connections entre cellules appartenant à différentes régions du cerveau. D'autre part, et de façon encore plus spectaculaire peut-être, la microscopie de fluorescence permet l'imagerie fonctionnelle des tissus. En neurosciences, il est ainsi possible de mesurer l'activité des milliers de neurones simultanément, avec une résolution cellulaire, au sein d'animaux vivants.

Après avoir introduit la fluorescence et les différents marqueurs fluorescents utilisés en biologie, nous présenterons le microscope de fluorescence le plus simple, le microscope plein champ. Nous étudierons son fonctionnement en détails et nous verrons qu'il présente une limitation sévère : pour un échantillon en volume, une grande partie des photons collectés sont émis par des plans éloignés du plan imagé et rajoutent une composante floue à l'image nette que l'on souhaite enregistrer. Nous présenterons ensuite les différentes techniques qui ont été développées au fil des années pour éliminer ces photons parasites et restaurer des images bien contrastées. Pour chacune des techniques introduites, nous présenterons quelques applications en biologie et plus particulièrement en neurosciences.

5.1 Fluorescence et marqueurs fluorescents pour la biologie

Dans cette première partie, nous nous proposons d'introduire le concept de fluorescence et de présenter les différents types de marqueurs fluorescents utilisés en biologie. Ce point de départ nous permettra de mieux cerner les spécifications que les techniques d'imagerie devront atteindre pour permettre l'observation des objets fluorescents dans de bonnes conditions.

5.1.1 Qu'est-ce que la fluorescence ?

Un objet (par exemple, une molécule) est fluorescent lorsqu'il peut absorber un photon pour passer dans un état excité, puis retourner vers l'état fondamental en émettant un photon d'énergie plus faible. Ce processus est illustré sur la figure 5.1A. On rappelle que l'énergie d'un photon est égale $h\nu$ où h est la constante de Plank ($h \approx 6.63 \times 10^{-34} \text{ J} \cdot \text{s}$) et ν la fréquence de l'onde électromagnétique associée au photon. Ainsi, la fréquence correspondant aux photons émis par fluorescence est plus faible que celle des photons absorbés, et leur longueur d'onde plus grande (c'est-à-dire décalée vers le rouge, voir figure 5.1B).

Introduisons d'ores et déjà quelques propriétés du processus d'émission de fluorescence qui seront utiles pour comprendre le fonctionnement des techniques de microscopie présentées par la suite :

- L'émission de fluorescence est un processus incohérent, ce qui signifie que la phase et la direction de propagation des ondes électromagnétiques associées aux photons émis sont aléatoires ;
- Avec le mécanisme d'émission de fluorescence représenté sur la figure 5.1A, le nombre de photons fluorescents émis est proportionnel au nombre de photons incidents : les techniques de microscopie reposant sur ce principe sont ainsi appelées méthodes « linéaires ». Nous verrons qu'il existe d'autres mécanismes pour lesquels 2 ou 3 photons (d'énergie plus faible) peuvent être absorbés simultanément pour conduire à

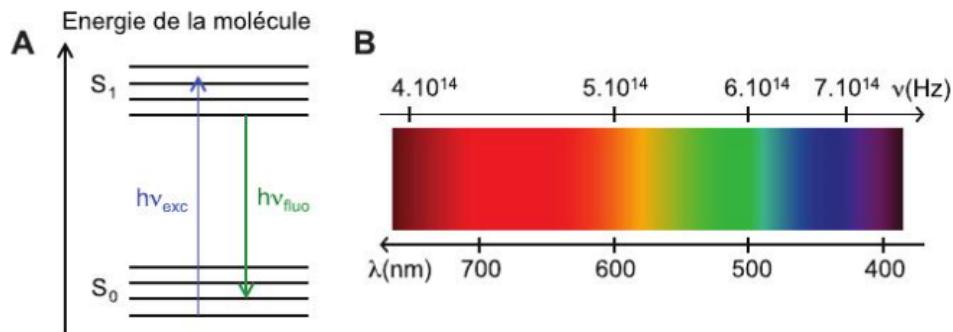


FIG. 5.1 – Introduction à la fluorescence. A) Niveaux d'énergie d'une molécule fluorescente. La molécule peut absorber un photon d'énergie $h\nu_{exc}$, et passer ainsi de l'état électronique fondamental (S_0) au premier état électronique excité (S_1), puis émettre un photon d'énergie $h\nu_{fluo}$, plus faible, pour retourner à l'état électronique fondamental. B) Spectre de la lumière visible étalonné en longueur d'onde (λ) et en fréquence (ν). λ et ν sont liés par la relation $\lambda = c/\nu$ où c est la vitesse de la lumière.

l'émission d'un seul photon fluorescent : dans ce cas, le nombre de photons fluorescents évolue de manière non-linéaire avec le nombre de photons incidents. Ces techniques de microscopie « multi-photons » ou « non-linéaires » feront l'objet d'un paragraphe particulier.

Il existe de nombreux objets fluorescents. Dans la vie de tous les jours, un exemple bien connu est celui des tubes fluorescents d'éclairage, ou celui, plus anecdotique, de l'eau tonique (la boisson Schweppes) rendue fluorescente par la présence de quinine. En biologie, plusieurs types d'objets fluorescents sont utilisés par les chercheurs, et notamment des molécules organiques, des nanocristaux de semi-conducteurs et des protéines. Les molécules organiques et nanocristaux de semi-conducteurs sont très bien décrites dans le chapitre 4 du livre « Physique et biologie : De la molécule au vivant »¹, où l'on trouvera également plus de détails sur le mécanisme de la fluorescence et notamment sur la relation de linéarité précédemment évoquée entre le nombre de photons émis et le nombre de photons incidents. Nous nous intéresserons ici plus particulièrement aux protéines fluorescentes qui ont révolutionné le domaine de l'imagerie pour la biologie et qui supplantent peu à peu les deux autres catégories.

5.1.2 Les protéines fluorescentes et leurs applications en biologie

La première protéine fluorescente a été découverte en 1962 par Osamu Shimomura. Elle a été baptisée « protéine fluorescente verte » (ou GFP pour

1. « Physique et biologie – De la molécule au vivant », J.-F. Allemand et P. Desbiolles, EDP Sciences, ISBN : 978-2-7598-0677-5.

Green Fluorescent Protein) parce que, comme son nom l'indique, elle émet des photons fluorescents de couleur verte. Elle provient de la méduse *aquaeria victoria* qui nage près des côtes nord américaines. Elle présente une structure en tonneau et abrite en son sein un chromophore (voir figure 5.2A).

Depuis sa découverte, l'étude de la GFP a fait l'objet de nombreux travaux scientifiques. Une étape marquante de ces recherches a été le clonage de son gène par Douglas Prasher en 1992, qui a permis de l'exprimer dans d'autres organismes que celui de *aquaeria victoria*. Fait remarquable, la protéine ainsi exprimée est aussi fluorescente, ce qui signifie qu'aucune enzyme spécifique de la méduse n'est nécessaire à l'obtention de la fluorescence. Ce clonage a ouvert un champ d'applications considérable, en permettant notamment d'étiqueter (*tagguer*) une protéine native d'intérêt pour suivre sa localisation au cours du temps dans un système vivant. Pour cela, le gène de la GFP est fusionné au gène d'intérêt, et le gène complet est exprimé dans l'organisme. Idéalement, cela conduit à l'expression d'une nouvelle protéine qui conserve les propriétés de la protéine native mais qui est fluorescente.

Des variantes de la GFP ont également été produites, permettant de modifier certaines de ses propriétés telles que les longueurs d'onde d'absorption et d'émission. Ainsi, il existe aujourd'hui toute une palette de protéines fluorescentes couvrant toutes les couleurs du spectre visible. Plusieurs protéines d'intérêt peuvent ainsi être suivies simultanément, identifiées par leur couleur. L'utilisation de protéines dont les longueurs d'onde d'absorption et d'émission sont décalées vers l'infrarouge permet également d'être moins sensible à la diffusion dans les tissus (voir chapitre 3).

Les protéines fluorescentes ont de nombreuses applications en biologie. Outre leur utilisation déjà évoquée en tant qu'« étiquette » et marqueur d'expression de protéines d'intérêt, elles sont également utilisées pour étudier l'interaction entre 2 protéines différentes au sein d'un organisme vivant. Dans ce cas, les 2 protéines d'intérêt sont couplées à 2 protéines fluorescentes de spectres différents, telles que la longueur d'onde des photons émis par la première corresponde à la longueur d'onde des photons absorbés par la seconde. Lorsque ces deux protéines sont très proches l'une de l'autre (à moins de 10 nm de distance), l'excitation de la première protéine peut être transférée à la seconde sans qu'il y ait d'émission de photons, par un mécanisme appelé « transfert d'énergie entre molécules fluorescentes ». La seconde protéine émet alors un photon de fluorescence. La détection de ces photons permet d'indiquer que les deux protéines sont en proximité (et la distance entre les 2 peut même être mesurée par une mesure ratiométrique de l'intensité de fluorescence aux deux couleurs).

Enfin, un dernier domaine d'applications majeur des protéines fluorescentes est celui de la caractérisation de leur environnement, par exemple la mesure de la concentration d'une espèce chimique dans le compartiment cellulaire où sont exprimées les protéines. Comme la fluorescence de la GFP native est relativement insensible à son environnement (le chromophore étant bien protégé par la structure en tonneau qui l'entoure), la protéine a dû être modifiée soit en

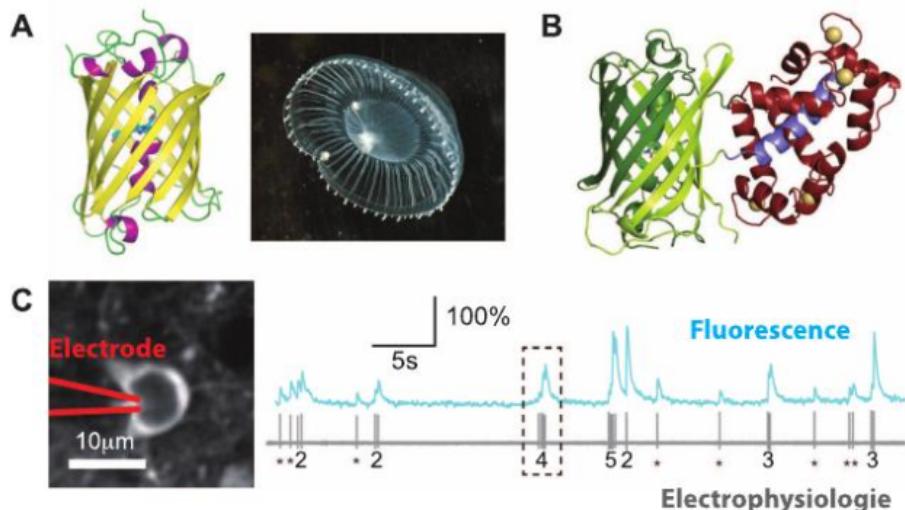


FIG. 5.2 – Protéines fluorescentes. A) A gauche : protéine fluorescente verte (GFP). A droite : méduse *aequorea victoria* dont elle est issue. Crédit : Sierra Blakely. B) Protéine GCaMP, constituée d'une GFP améliorée (à gauche) liée au groupe calmoduline (à droite). La calmoduline peut lier les ions calcium, représentés ici par des petites sphères. Elle change alors de conformation, ce qui entraîne une modification de la fluorescence de la GFP. Crédit : <https://brainwindows.wordpress.com>. C) Mesure de l'activité électrique d'un neurone à l'aide de GCaMP6, l'un des multiples variants de la famille des GCaMP. A gauche : Image de fluorescence du neurone, indiquant la localisation des protéines GCaMP6 dans le cytoplasme. Une électrode représentée en rouge permet de mesurer l'activité électrique du neurone par électrophysiologie. A droite : Fluorescence du neurone au cours du temps (trace du haut) et activité électrique correspondante mesurée par électrophysiologie (trace du bas). A chaque émission d'un potentiel d'action (trait vertical sur la trace du bas correspondant à une dépolarisation très rapide de la membrane du neurone), la fluorescence de GCaMP6 augmente transitoirement. Ainsi, l'évolution temporelle de la fluorescence de GCaMP6 permet de suivre indirectement l'activité du neurone. Crédit : Adapté de Chen et al, Nature 499 : 295 (2013)

réalisant des mutations au sein de la protéine elle-même, soit par l'association avec une autre protéine. Ainsi, par exemple, le couplage avec la calmoduline (une protéine liant les ions calcium) a donné naissance à une nouvelle protéine, appelée GCaMP, dont la fluorescence dépend de la concentration en ions calcium dans le milieu. Cette protéine est utilisée dans de très nombreuses études de neurosciences. En effet, comme l'activité électrique des neurones s'accompagne de changements transitoires de la concentration en ions calcium, la mesure de la fluorescence de GCaMP permet de mesurer l'activité des neurones (voir figure 5.2B-C). Comme nous le verrons par la suite, grâce à diverses techniques d'imagerie de fluorescence, il est ainsi possible de suivre l'activité de centaines voire de milliers de neurones simultanément, au sein d'un animal vivant, éveillé et réalisant une tâche comportementale. Cela permet d'étudier

les bases neuronales de différents comportements et d'observer comment ce codage évolue au cours du temps.

Qu'est-ce qui fait l'intérêt des protéines fluorescentes par rapport aux autres marqueurs fluorescents ? On peut citer plusieurs raisons fondamentales : les protéines fluorescentes sont peu toxiques pour les organismes vivants ; elles sont exprimées par la machinerie des cellules et leur expression peut durer pendant plusieurs semaines ou plusieurs mois, permettant ainsi des études à long terme ; enfin, ces protéines peuvent être adressées génétiquement à un compartiment d'intérêt de la cellule ou à un type de cellules bien précis de l'organisme, permettant une dissection précise des processus biologiques. La GFP et ses dérivées ont donc révolutionné l'imagerie de systèmes biologiques, ce qui a été reconnu par l'attribution du prix Nobel de chimie à Osamu Shimomura, Martin Chalfie et Roger Tsien en 2008 pour leurs travaux sur la GFP.

Maintenant que nous avons introduit la fluorescence et les principaux objets fluorescents utilisés en biologie, nous allons nous tourner vers la description des différentes méthodes d'imagerie de ces objets fluorescents.

5.2 Microscopie plein champ conventionnelle

Comme nous l'avons vu dans le chapitre 1, le but d'un microscope est d'effectuer une image agrandie d'un objet de petite taille, pour visualiser des détails dont les dimensions sont à l'échelle du micromètre, voire plus fines encore. Pour cela, on place l'objet à observer (ici, un objet fluorescent) au voisinage du plan focal d'un objectif de microscope, et on réalise une image de cet objet sur un détecteur (une caméra par exemple). Les différentes techniques de microscopie de fluorescence sont caractérisées par deux éléments :

- la façon dont l'échantillon fluorescent est éclairé, en vue d'obtenir une émission de fluorescence (partie illumination) ;
- la façon dont la fluorescence émise est collectée et dont l'image est formée (partie détection).

La technique de microscopie de fluorescence la plus simple consiste à éclairer l'échantillon de manière uniforme, à collecter la fluorescence émise par un objectif de microscope et à en faire l'image sur une caméra au moyen d'une lentille de tube (figure 5.3). Cette méthode est dénommée « microscopie plein-champ conventionnelle ». L'architecture du microscope est très proche de celle décrite dans le chapitre 1 (la partie détection est identique), si bien que ses propriétés en sont similaires. Dans cette section, nous décrirons le principe de fonctionnement de ce microscope, et nous en tirerons ses principales caractéristiques. Nous verrons également que les images enregistrées présentent un signal de fond très important, ce qui constitue la principale limitation de cette méthode et qui a motivé le développement de nombreuses techniques alternatives.

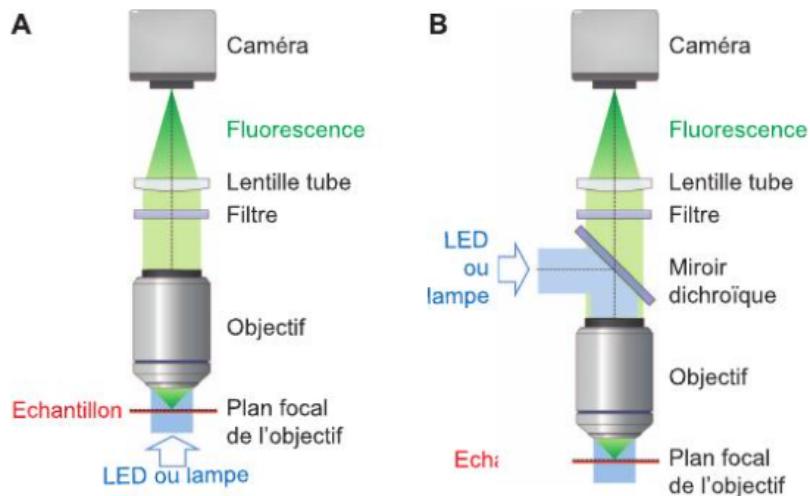


FIG. 5.3 – Schéma d'un microscope de fluorescence plein champ conventionnel. A) Géométrie de transmission. B) Géométrie de réflexion (épifluorescence).

5.2.1 Architecture et grandissement du microscope plein champ

Le microscope plein-champ se décline selon deux architectures différentes : la fluorescence peut être collectée dans une géométrie de transmission par rapport à l'illumination (figure 5.3A) ou dans une géométrie de réflexion (figure 5.3B). Dans le second cas, on parle aussi de microscopie par épi-fluorescence. L'excitation et la fluorescence sont alors séparées par un miroir dichroïque qui a pour propriété de réfléchir la lumière à la longueur d'onde de l'excitation et transmettre la lumière à la longueur d'onde de la fluorescence. Les propriétés du microscope sont indépendantes de la façon dont l'illumination (uniforme) est acheminée vers l'échantillon, et ne dépendent que du trajet de détection entre l'échantillon et la caméra. Un partie de ces propriétés ont été décrites au chapitre 1 mais nous les rappelons brièvement ici, avant de pousser leur étude plus loin.

Pour étudier le trajet de détection, on modélise la lentille tube et l'objectif de microscope par deux lentilles minces, de distances focales respectives f_t et f_o . Ces lentilles sont disposées suivant un arrangement dit « 4f », schématisé sur la figure 5.4A : la distance entre les 2 lentilles est égale à $f_t + f_o$, l'objet imagé se trouve au plan focal objet de l'objectif et l'image au plan focal image de la lentille tube, si bien que la distance entre l'objet et l'image est égale à $2f_t + 2f_o$ (soit 4f si ces distances étaient égales). Une telle configuration permet effectivement de réaliser une image de l'objet sur la caméra. De plus, un diaphragme, appelé pupille, est placé dans le plan focal image de l'objectif et limite l'angle d'ouverture des rayons lumineux collectés par l'objectif.

On définit le grandissement du microscope par le rapport entre les tailles de l'image et de l'objet. Pour calculer ce grandissement, on applique les lois

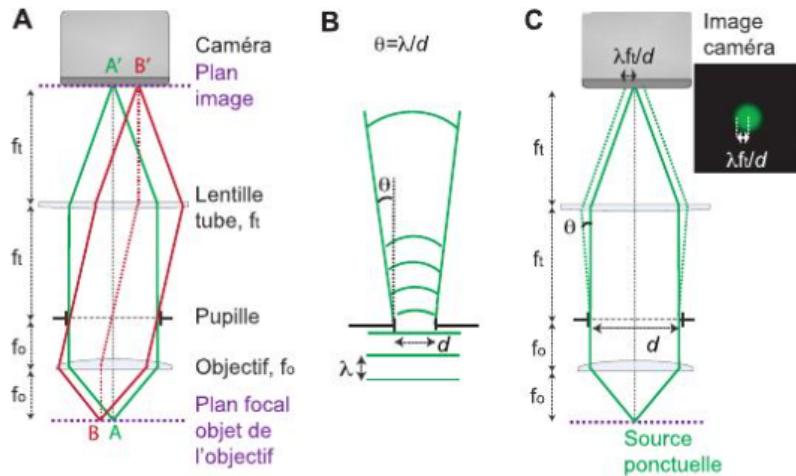


FIG. 5.4 – Architecture de la partie détection du microscope plein champ. A) La modélisation du microscope par un système « 4f » permet de calculer le grandissement $A'B'/AB = f_t/f_o$. B) Diffraction d'un faisceau parallèle par une ouverture de taille d . C) La résolution du microscope est imposée par la diffraction sur la pupille.

de l'optique géométrique. Sur le schéma de la figure 5.4A, on a représenté les rayons lumineux permettant de construire l'image $A'B'$ d'un objet étendu AB . Considérons le trajet en pointillés rouge, et plus précisément la partie de ce trajet située entre les 2 lentilles. Par des considérations géométriques simples (en appliquant le théorème de Thalès par exemple), on peut établir que $A'B'/AB = f_t/f_o$. Le grandissement du microscope est donc égal au rapport des distances focales de la lentille tube et de l'objectif de microscope. En pratique, les fabricants d'objectifs de microscope classifient les objectifs par leur grandissement (x10, x20...) plutôt que par leur distance focale, ce qui est un peu contre-intuitif puisque comme on vient de le voir le grandissement dépend de la distance focale de la lentille tube. En fait, pour chaque fabricant, la distance focale de la lentille tube est fixée (par exemple pour Olympus elle est égale à 180 mm) si bien que la grandissement de l'objectif détermine sa distance focale (18 mm dans le cas d'un objectif Olympus x10).

5.2.2 Définition de la PSF et résolution latérale

Pour étudier la formation des images en microscopie, on décrit l'objet fluorescent étendu comme un ensemble d'objets ponctuels et on calcule l'image finale comme la somme des contributions de chacun de ces points objets. L'une des grandeurs fondamentales est ainsi la fonction d'étalement du point ou PSF (pour *point spread function* en anglais) qui correspond à la distribution d'intensité lumineuse collectée pour un point objet de l'échantillon. Cette grandeur a déjà été introduite dans les chapitres 1 et 2 pour le microscope conventionnel. Pour un microscope de fluorescence, elle se définit comme le produit des PSF d'illumination et de détection :

- La **PSF d'illumination** quantifie la probabilité qu'un objet ponctuel fluorescent de l'échantillon soit excité en fonction de sa position. Pour une technique de microscopie linéaire comme c'est le cas ici, la PSF d'illumination est directement proportionnelle à la répartition spatiale d'intensité du faisceau d'illumination. Dans le cas du microscope plein champ, l'illumination est uniforme, ce qui signifie que la PSF d'illumination est uniforme elle-aussi : $\text{PSF}_{\text{ill}} = 1$.
- La **PSF de détection** quantifie la distribution spatiale d'intensité produite par un objet fluorescent ponctuel. Comme cela a été introduit dans les chapitres 1 et 2, c'est la diffraction qui détermine la taille et la forme de cette PSF. La figure 5.4B rappelle qu'un faisceau incident sur un diaphragme de diamètre d diffracte selon un cône de lumière faisant un angle $\theta = \lambda/d$ avec le faisceau incident. Il se produit le même phénomène dans le microscope (figure 5.4C) : le faisceau de fluorescence issu d'un objet ponctuel diffracte sur la pupille du microscope, formant un cône lumineux caractérisé par un angle $\theta = \lambda/d$ avec l'axe optique et donnant ainsi une image de taille $\lambda f_o / d$ sur la caméra. Pour des raisons pratiques, on définit plutôt la PSF dans les coordonnées de l'échantillon que dans celles du détecteur, et ainsi la taille de la PSF de détection est de $\lambda f_o / d$ (en tenant compte du grandissement calculé plus haut).

Comme la PSF d'illumination du microscope plein champ est uniforme, sa PSF globale est égale à cette PSF de détection. Sa taille détermine la résolution latérale du microscope : deux points objets peuvent être distingués seulement s'ils donnent des taches distinctes sur la caméra, c'est-à-dire qu'ils doivent être séparés par une distance supérieure à $r = \lambda f_o / d$. Lors de l'implémentation du microscope, on choisit une caméra avec des pixels plus petits que la tâche de diffraction, de façon à ce que la résolution du microscope soit limitée par la diffraction et non pas par la taille des pixels.

Notons enfin qu'en pratique, la pupille du système fait partie intégrante de l'objectif de microscope, et ainsi la quantité $d/2f_o$ est une grandeur caractéristique de l'objectif. Elle correspond au demi-angle d'ouverture du faisceau collecté par l'objectif et est appelée ouverture numérique (NA). Ainsi, la résolution du microscope ne dépend que de l'ouverture numérique de l'objectif : $r = \lambda/(2\text{NA})$.

5.2.3 Forme de la PSF dans les 3 dimensions spatiales

Comme les objets biologiques sont par essence tridimensionnels, nous devons déterminer la PSF dans les 3 dimensions de l'espace pour comprendre comment ces objets sont imaginés par le microscope.

Nous avons mentionné que la PSF est définie dans les coordonnées de l'échantillon. Pour simplifier, nous allons considérer dans la suite que le grandissement du microscope est égal à 1, ce qui permet d'avoir les mêmes dimensions dans l'espace objet et dans l'espace image et de calculer la PSF dans l'espace image. La PSF du microscope plein champ décrit la distribution

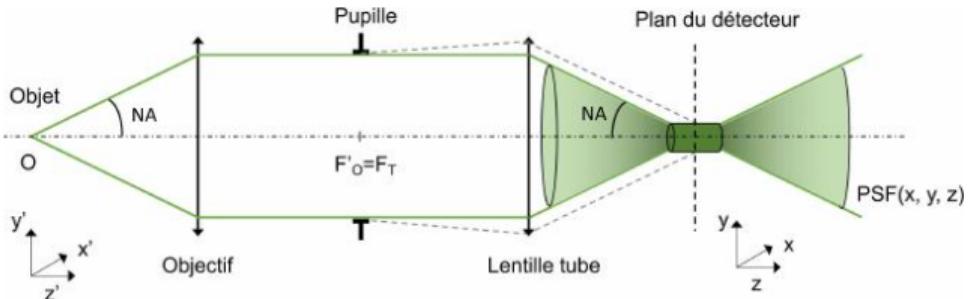


FIG. 5.5 – PSF du microscope plein champ selon les 3 dimensions spatiales.

d'intensité obtenue pour un point objet O situé au point focal objet de l'objectif de microscope (figure 5.5). On peut observer l'allure de cette PSF dans 2 régions de l'espace :

- Près du plan du détecteur, la PSF est un cylindre de rayon $\lambda/(2NA)$. Dans un plan perpendiculaire à l'axe optique, il s'agit d'un disque de surface $\pi(\lambda/(2NA))^2$. La valeur de la PSF en un point de ce disque est donc de $I_0/\pi(\lambda/(2NA))^2$, avec I_0 l'intensité totale détectée pour ce point objet.
- Loin du détecteur, les lois de l'optique géométrique s'appliquent et le faisceau lumineux a la forme d'un cône centré sur le point focal image de la lentille tube, avec un demi-angle d'ouverture égal à l'ouverture numérique de l'objectif (NA). Dans un plan perpendiculaire à l'axe optique, la PSF a donc la forme d'un disque de rayon zNA et de surface $\pi(zNA)^2$. La valeur de la PSF en un point de ce disque est alors de $I_0/\pi(zNA)^2$, puisque qu'il y a conservation de l'énergie lumineuse tout au long de la propagation du faisceau.
- L'intersection entre ces deux régions est obtenue pour $z_0 NA = \lambda/(2NA)$, c'est-à-dire $z_0 = \lambda/(2NA^2)$. Cette valeur définit la taille de la PSF selon l'axe z , et donc la résolution axiale du microscope. En effet, la valeur de la PSF sur l'axe optique est constante pour des distances par rapport au plan du détecteur inférieures à z_0 , et diminue en fonction de z pour des distances plus importantes.

Notons que ces expressions de la PSF sont des approximations et qu'un calcul plus précis peut être fait en optique ondulatoire. Néanmoins, ces approximations sont suffisamment précises pour expliquer de nombreuses propriétés du microscope, c'est pourquoi nous avons décidé de les utiliser ici.

5.2.4 Formation des images

Étudions maintenant la formation d'images dans le cas d'un objet étendu, en commençant pas le cas d'un objet à 2 dimensions situé dans le plan focal de l'objectif de microscope. On décompose l'objet en objets ponctuels $O(x', y', 0)$ (voir figure 5.6A). Chacun de ces objets ponctuels donne une tache lumineuse

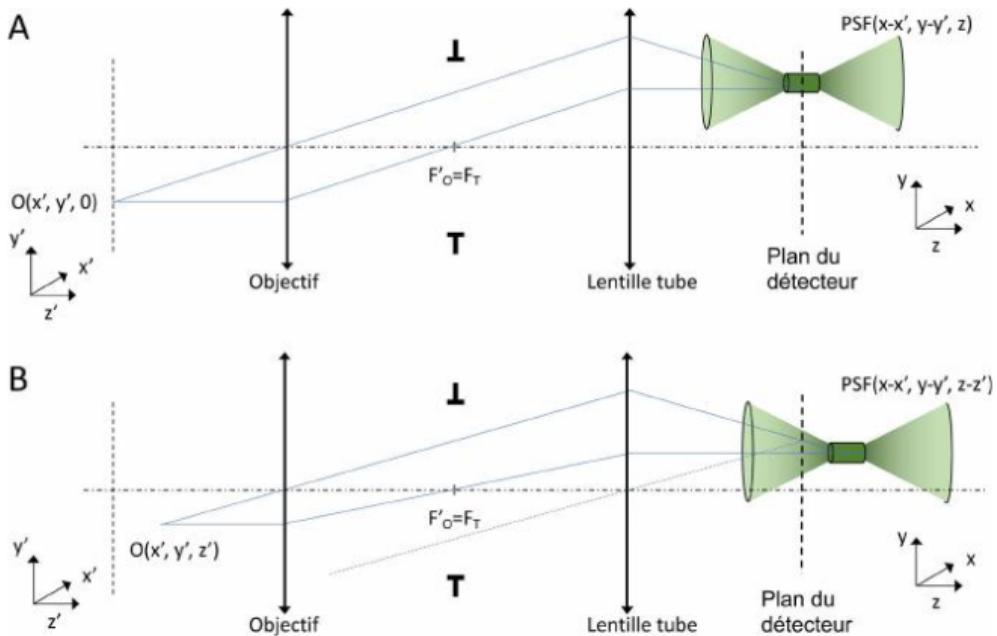


FIG. 5.6 – Image obtenue dans le cas d'un objet ponctuel dans le plan focal objet (A) ou défocalisé (B).

dans le plan image centrée sur son image géométrique $(x', y', 0)$, et qui a pour intensité $O(x', y', 0) \times \text{PSF}(x - x', y - y', z)$ (O correspond à la distribution de fluorescence de l'objet étendu). L'image se calcule ensuite comme la somme continue des contributions de tous les objets ponctuels, qui s'écrit ainsi :

$$I_{\text{image}}(x, y, z = 0) = \iint O(x', y', 0) \times \text{PSF}(x - x', y - y', z = 0) dx' dy' \quad (5.1)$$

Cette opération mathématique est un produit de convolution. C'est une opération de filtrage par un filtre passe bas (la PSF), au cours de laquelle les détails les plus fins de l'objet sont perdus. En effet, chaque point de l'objet devient une tache plus large (la PSF) dont l'intensité va se superposer avec l'intensité correspondant aux points adjacents de l'objet. Ce processus est illustré sur la figure 5.7, qui montre l'imagerie de neurones en culture avec deux PSF de tailles différentes. Plus la PSF est grande, plus la résolution se dégrade, c'est-à-dire plus on perd la finesse des structures imagées.

Dans le cas d'un objet tridimensionnel, on reprend exactement le même raisonnement. On décompose l'objet en objets ponctuels $O(x', y', z')$ localisés dans tout l'espace (figure 5.6B). Chacun de ces points donne une tache lumineuse dans l'espace image centrée sur son image géométrique (x', y', z') d'intensité $O(x', y', z') \times \text{PSF}(x - x', y - y', z - z')$. L'image se calcule ensuite comme la somme continue en 3 dimensions des contributions de toutes ces taches images :

$$I_{\text{image}}(x, y, z = 0) = \iiint O(x', y', z') \times \text{PSF}(x - x', y - y', z - z') dx' dy' dz' \quad (5.2)$$

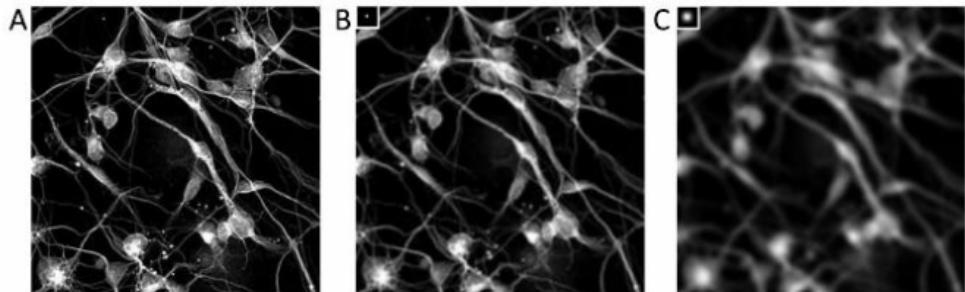


FIG. 5.7 – Images de neurones fluorescents en culture réalisées avec des PSF de différentes tailles. A) Objet. B) Image réalisée avec une PSF de petite taille, présentant une résolution spatiale fine. Les processus des neurones sont bien apparents. C) Image réalisée avec une PSF trois fois plus large que dans le cas B. Les PSF sont présentées en insert des images. Les images sont calculées numériquement par l'équation 5.1.

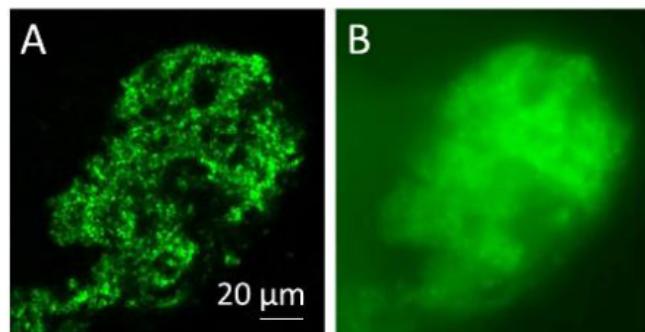


FIG. 5.8 – Imagerie du bulbe olfactif d'une souris (région du cerveau impliquée dans le traitement des odeurs). A. Partie de l'objet situé dans le plan focal. B. Image obtenue par microscopie plein champ conventionnelle et qui présente un fond flou important. Crédit : adapté de Ventalon et al., Optics Letters 32 : 1417 (2007)

On remarque que les points objets situés hors du plan focal de l'objectif de microscope donnent des taches lumineuses plus larges que les points situés dans le plan focal (figure 5.6). Ces parties de l'objet apparaissent donc floues, de la même façon que quand on fait de la photographie et qu'on met au point sur un objet proche de l'appareil photo, le paysage lointain apparaît flou sur la photo. Ainsi, lorsque l'on image un échantillon tri-dimensionnel, on enregistre deux contributions sur la caméra : une image nette correspondant à la partie de l'objet fluorescent situés sur le plan focal (appelée « signal ») et une image floue correspondant aux parties situées hors du plan focal (appelée « fond »). Cette dernière contribution peut être considérée une pollution lumineuse de l'image nette que l'on aimera observer, comme l'illustre la figure 5.8.

Quelle est l'intensité de ce fond flou ? Les images sont-elles significativement dégradées, comme semble le montrer la figure 5.8 ?

5.2.5 Le problème du fond

Pour répondre à ces questions, nous nous proposons maintenant de quantifier ce fond fluorescent. Nous avons vu que les objets ponctuels défocalisés produisent des taches lumineuses larges et peu intenses sur la caméra. Le fond flou provient donc d'objets défocalisés et étendus, pour lesquels les contributions des différents points s'additionnent. Pour le quantifier, les microscopistes choisissent comme objet un plan fluorescent, et ils évaluent l'intensité détectée sur la caméra en fonction de la position z'_P du plan fluorescent par rapport au plan focal. Idéalement, le plan fluorescent ne doit être visible que lorsqu'il est au plan focal de l'objectif, c'est-à-dire que le signal mesuré doit décroître avec $|z'_P|$. Cette approche permet de décomposer les contributions des différentes couches d'un objet étendu sur l'image finale.

Étudions tout d'abord la situation de manière qualitative, en reprenant le même type de schémas que précédemment. Nous considérons maintenant un objet fluorescent plan constitué d'une superposition de points situés dans le plan focal (figure 5.9A) ou hors du plan focal (figure 5.9B). Dans le second cas, les cônes de lumière correspondants aux différents points sources se superposent et se somment, et la somme de ces intensités prise au plan du détecteur est quasiment identique à l'intensité obtenue dans le premier cas. En effet, l'enveloppe des faisceaux lumineux a quasiment la même taille, et l'intensité totale comprise dans cette enveloppe est strictement identique dans les deux cas. Ainsi, l'intensité détectée ne dépend quasiment pas de la position du plan fluorescent.

On peut retrouver ce résultat mathématiquement, en remplaçant dans l'équation 5.2 l'objet par un plan fluorescent uniforme. On obtient :

$$I_{\text{image}}(x, y, z = 0) = O_P \iiint \text{PSF}(x - x', y - y', -z'_P) dx' dy' \quad (5.3)$$

Nous avons vu que par conservation de l'énergie, l'intégrale de la PSF sur des plans perpendiculaires à l'axe optique est constante (elle correspond à l'intensité totale du faisceau lumineux émis par un point source) : on retrouve donc que l'intensité détectée ne dépend pas de la position du plan fluorescent.

Ainsi, si on revient au cas général d'un objet quelconque très étendu selon l'axe optique, toutes les couches de l'objet contribuent de façon similaire à l'image finale. Or, il y a en général beaucoup plus de parties de l'objet hors du plan focal que dans le plan focal ! Ainsi l'image enregistrée peut se retrouver dominée par le fond flou, comme c'est le cas dans la figure 5.8B. Ce problème est un problème majeur dans le domaine de l'imagerie de fluorescence. Ainsi, un enjeu important a été de trouver des méthodes efficaces pour rejeter ce fond flou et n'enregistrer que la partie nette correspondant à l'intersection de

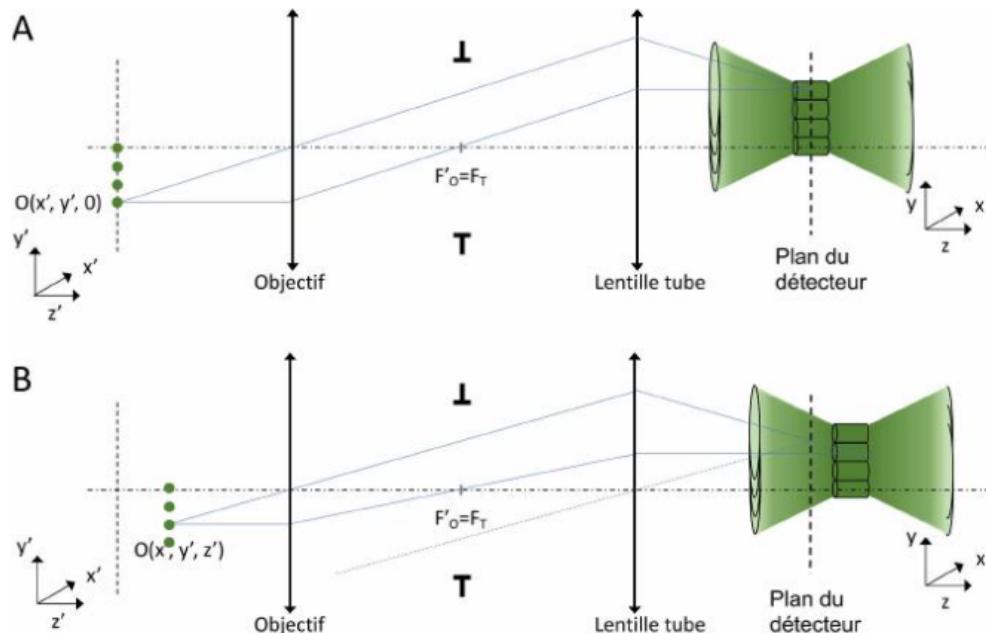


FIG. 5.9 – Imagerie d'un plan fluorescent (juxtaposition de points sources contigus) situé dans le plan focal (A) et hors du plan focal (B) de l'objectif de microscope.

l'objet avec le plan focal de l'objectif de microscope, c'est-à-dire effectuer du sectionnement optique.

5.2.6 Une application de la microscopie plein champ en neurosciences

Malgré cette absence de sectionnement optique, la microscopie plein champ reste une technique très utilisée en biologie, notamment parce qu'elle permet d'imager des grands champs de vue et qu'elle peut fonctionner à haute cadence. De plus, l'architecture du microscope est relativement simple ce qui en fait une technique facilement miniaturisable. Ainsi, des microscopes plein champ miniatures, d'une taille de quelques centimètres et d'un poids de 2 grammes seulement ont été développés et commercialisés. Ces microscopes ont trouvé des applications très importantes en neurosciences : en effet, ils peuvent être fixés sur la tête d'une souris pour enregistrer l'activité des neurones (avec les indicateurs fluorescents calciques présentés plus hauts) pendant que la souris se comporte librement. Ils permettent ainsi d'explorer des questions majeures des neurosciences intégratives, et en particulier d'étudier comment différents processus tels que le comportement de l'animal, la mémoire ou la perception sensorielle sont codés par les neurones. La figure 5.10 montre l'une des ces applications pour l'étude du codage de l'espace. Les auteurs ont enregistré l'activité de cellules de lieu, des cellules de l'hippocampe impliquées dans la

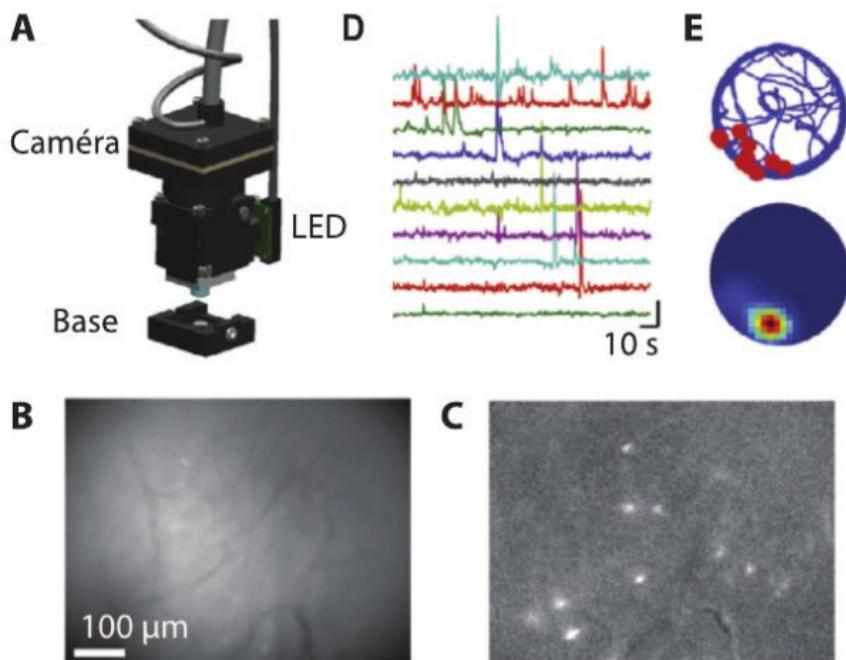


FIG. 5.10 – A) Vue détaillée d'un microscope miniature. La pièce de base se fixe sur le crâne de la souris tandis que le corps du microscope est détachable. B) Image brute enregistrée avec le microscope miniature A de l'hippocampe d'une souris se déplaçant librement dans son environnement. Les neurones de l'hippocampe expriment GCaMP. L'image présente un fond flou important, si bien qu'on ne peut pas distinguer les neurones. C) Différence entre l'image brute B et une estimation du fond flou déterminée à partir d'une pile d'images enregistrée au cours du temps. Cette différence permet de faire apparaître un dizaine de neurones actifs (tâches blanches) au moment de la prise d'image. D) En mesurant l'évolution temporelle du signal centré sur différents neurones de l'image C, on peut extraire leur activité au fil du temps. Cette activité est représentée ici pour 10 neurones. Les augmentations transitoires de signal correspondent à des périodes d'activité des neurones. E) En haut : trajectoire d'une souris (en bleu) se déplaçant dans un environnement de forme circulaire. Les points rouges marquent les positions où l'un des neurones choisi dans l'image C présente une activité. En bas : activité moyenne de ce neurone en fonction de la position de la souris. Le neurone s'active spécifiquement quand la souris est en bas de l'environnement. Il est donc une cellule de lieu codant pour la partie basse de l'environnement. Crédit : adapté de Ziv and Ghosh, Current Opinion in Neurobiology 32 : 141–147 (2015)

représentation spatiale. Chacune de ces cellules est active lorsque l'animal se trouve à une position spécifique dans son environnement. Les chercheurs ont enregistré les mêmes cellules pendant plusieurs mois pour chercher à comprendre comment la représentation de l'espace évolue au cours du temps.

5.2.7 Conclusion

La microscopie de fluorescence plein champ conventionnelle est une technique simple, rapide, et facilement miniaturisable. Cependant, nous avons vu qu'elle présente une limitation importante : son incapacité à rejeter le fond flou provenant des plans éloignés du plan focal de l'objectif. Dans la suite de ce chapitre, nous allons montrer les efforts qui ont été réalisés dans le domaine de l'imagerie de fluorescence pour extraire le signal du plan focal et éliminer au maximum la lumière qui provient des autres plans. Pour cela, la plupart des méthodes jouent sur un degré de liberté qui a été ignoré jusqu'ici : la mise en forme du faisceau d'illumination. L'idée générale est de réduire l'illumination des parties de l'objet situées hors du plan focal. Cette idée a été déclinée de multiples façons, et nous allons aborder et décrire les principales méthodes utilisées à ce jour.

5.3 Microscopies à balayage laser

Historiquement, la première idée qui est apparue pour obtenir cette propriété de sectionnement optique est de focaliser le faisceau exciteur dans l'échantillon, puis de le balayer pour construire une image. Deux variations importantes de cette idée sont toujours parmi les méthodes les plus employées aujourd'hui pour l'imagerie des systèmes biologiques : la microscopie confocale (dont l'idée a été introduite par Marvin Minsky en 1953) et la microscopie à deux photons (développée en 1990 par Watt W. Webb, Winfried Denk et Jim Strickler).

5.3.1 Microscopie confocale

5.3.1.1 Principe de fonctionnement

Comment la focalisation du faisceau exciteur permet-elle de réduire l'illumination des plans hors focus et d'améliorer le sectionnement optique ? Pour le comprendre, observons les schémas de principe de la figure 5.11A-B. L'idée est maintenant d'utiliser un laser pour focaliser la lumière et éclairer principalement le point focal objet de l'objectif de microscope. Un objet situé en ce point est ainsi excité de façon optimale, et il émet de la fluorescence qui est collectée par un détecteur placé dans un point conjugué de ce point focal (c'est-à-dire, comme pour le microscope plein champ, au niveau de l'image réalisée par l'objectif et la lentille de tube). Dans le cas d'un point objet situé hors du plan focal (figure 5.11B) l'illumination est réduite car le faisceau d'illumination a divergé depuis le point focal : la fluorescence émise est donc plus faible. De plus, le faisceau fluorescent est défocalisé lorsqu'il arrive au niveau du détecteur. Seule la partie centrale du faisceau, correspondant au point conjugué du point illuminé (« con-focal ») est détectée, ce qui permet d'éliminer une grande partie de la fluorescence émise par le point source défocalisé. Ainsi, la propriété de sectionnement optique vient à la fois de l'illumination et de la détection.

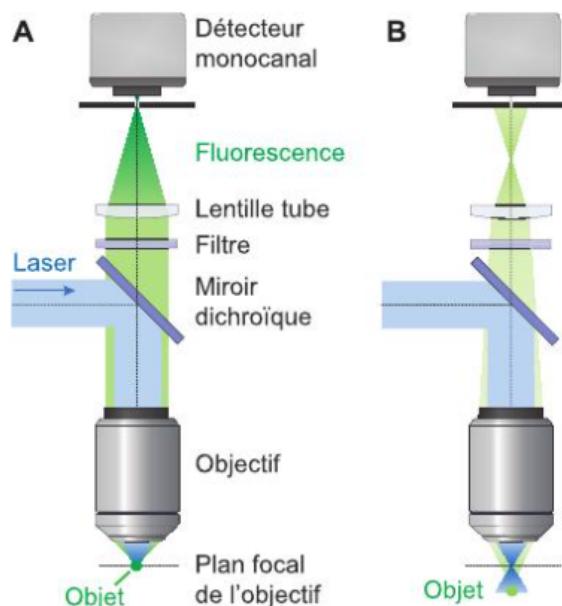


FIG. 5.11 – Principe de la microscopie confocale. Imagerie d'un point objet situé dans le plan focal (A) et hors du plan focal (B).

On peut retrouver ce principe de fonctionnement avec le formalisme des PSFs, comme illustré sur la figure 5.12B. Comme nous l'avons décrit pour le microscope plein champ, il faut considérer 2 PSF : la PSF d'éclairage qui décrit la répartition spatiale d'intensité de l'éclairage au niveau de l'échantillon, et la PSF de détection qui décrit la répartition d'intensité détectée pour un objet fluorescent ponctuel. La PSF de détection est identique pour le microscope plein champ et le microscope confocal : elle est déterminée uniquement par l'objectif de microscope (et sa pupille) selon la figure 5.5. Par contre, dans le cas du microscope confocal, l'éclairage est focalisé par le même objectif de microscope, et donc la PSF d'éclairage est égale à la PSF de détection (figure 5.12A). Ainsi, la PSF totale du microscope confocal est égale au carré de la PSF du microscope plein champ, et la valeur de cette PSF décroît beaucoup plus vite lorsqu'on s'éloigne du plan focal, comme l'illustre la figure 5.12B. La décroissance mesurée sur l'axe optique évolue en $1/z^4$ contre $1/z^2$ pour le microscope plein champ.

Pour quantifier le sectionnement optique, considérons à nouveau un plan fluorescent. On étudie le cas où le plan fluorescent est dans le plan focal, et le cas où il est éloigné d'une distance z'_P grande devant la résolution axiale du microscope. Comme précédemment, on décompose le plan en points objets et on étudie la formation de l'image correspondante (figure 5.13). Comme la PSF du microscope confocal décroît beaucoup plus vite avec z que celle du microscope plein champ, on observe cette fois-ci une décroissance de l'intensité sur le plan du détecteur lorsque l'objet n'est pas dans le plan focal.

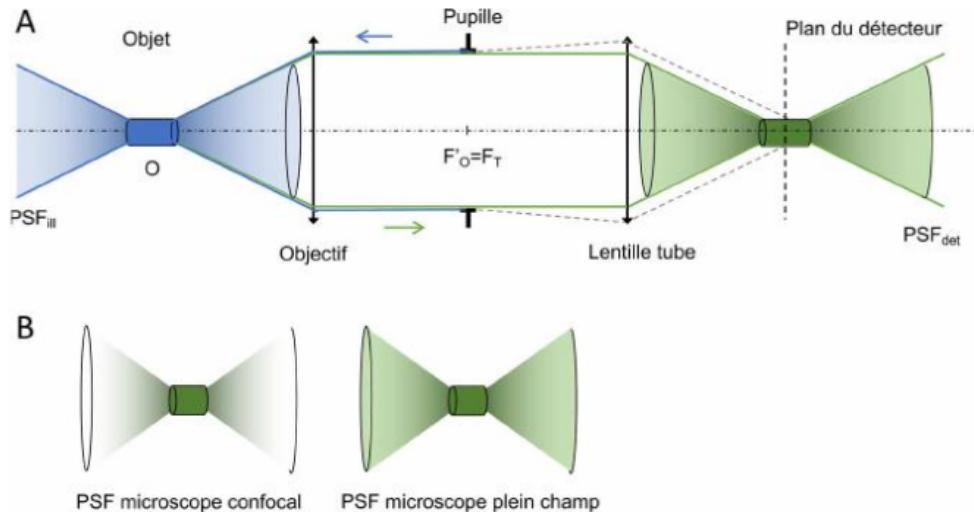


FIG. 5.12 – PSF du microscope confocal. A) PSF d'illumination (en bleu) et de détection (en vert). La PSF d'illumination correspond à la répartition d'intensité du faisceau d'illumination. Celui-ci est focalisé suivant une tâche dont la taille est déterminée par la diffraction sur la pupille de l'objectif ($r = \lambda/2NA$). Les deux PSF sont donc identiques. B) La PSF complète du microscope confocal (à gauche) est le produit des PSF d'illumination et de détection. Elle décroît beaucoup plus vite lorsqu'on s'éloigne du plan focal que la PSF du microscope plein champ (à droite).

Pour quantifier cette décroissance, on peut reprendre l'équation 5.3 qui s'applique encore, mais avec la nouvelle expression de la PSF. Considérons un plan à une distance z'_P du plan focal. La taille de la PSF n'a pas changé par rapport à celle du microscope plein champ, sa surface est donc toujours $\pi(z'_P NA)^2$. L'intensité de la PSF est par contre le carré de ce qu'elle était précédemment : elle est donc proportionnelle à $1/(z'_P NA)^4$. L'intensité détectée est proportionnelle à l'intégrale de la PSF sur le plan fluorescent, c'est-à-dire au produit de l'intensité de la PSF en chaque point par sa taille : elle est donc proportionnelle à $1/(z'_P)^2$. Ainsi, l'intensité détectée décroît très vite avec z'_P : le microscope confocal permet un très bon sectionnement optique. Par conséquent, pour un objet étendu dans les 3 dimensions, les parties de l'objet situées loin du plan focal contribuent très peu au signal détecté.

5.3.1.2 Implémentation de la microscopie confocale

On a décrit pour l'instant comment mesurer le signal pour un point unique dans l'échantillon, le point focal objet de l'objectif. Cependant, le but d'une technique de microscopie est de réaliser une image d'un objet étendu. Comment y parvenir à partir de l'idée précédente ? Il faut pour cela éclairer séquentiellement chacun des points de l'échantillon, ce qui peut-être réalisé soit en déplaçant l'échantillon, soit en balayant le faisceau d'excitation. La première solution est la plus simple conceptuellement. L'idée est donc de déplacer l'échantillon

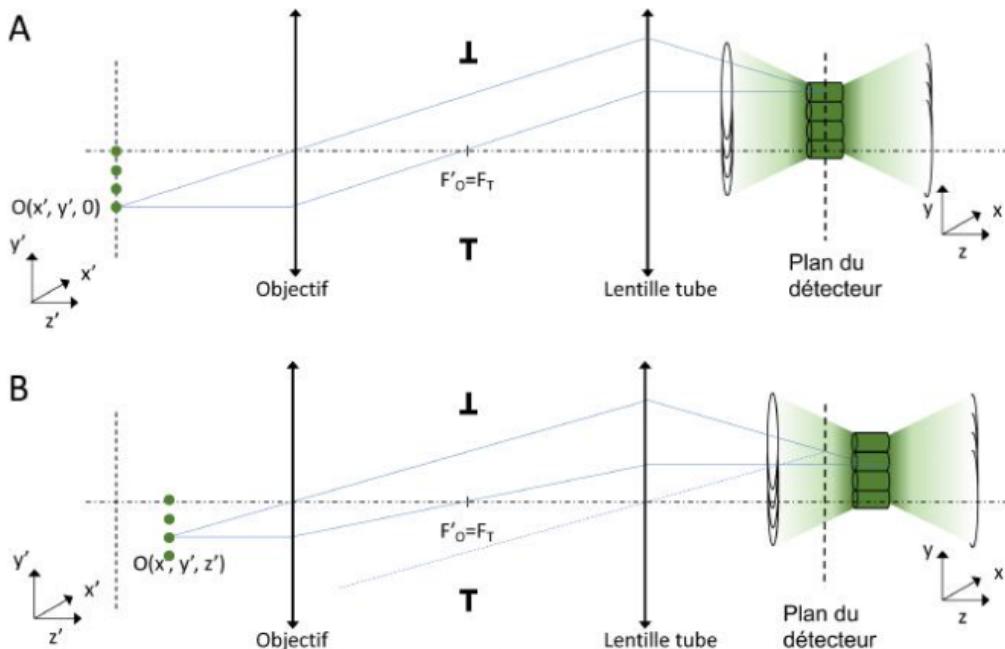


FIG. 5.13 – Sectionnement optique du microscope confocal. Imagerie d'un objet étendu situé dans le plan focal de l'objectif (A) et en dehors de ce plan focal (B).

latéralement au moyen d'un moteur, d'enregistrer l'intensité de fluorescence sur le détecteur pour chaque position de l'échantillon, et de reconstruire l'image *a posteriori*. Cette solution est mise en place sur certains microscopes, mais elle est relativement lente et n'est pas adaptée à tous les échantillons biologiques : en effet, il est difficile par exemple de déplacer une souris vivante rapidement et avec une précision de l'ordre de la résolution du microscope (inférieure au micron, le plus souvent) ! Ainsi, pour la plupart des microscopes confocaux, l'échantillon est fixe et ce sont les points d'excitation et de détection qui sont balayés. Pour cela, on modifie l'angle de propagation du faisceau d'illumination dans un plan conjugué de la pupille du microscope au moyen d'un miroir rotatif (voir figure 5.14). Pour la détection, on fait passer le faisceau de fluorescence dans le même système de balayage, de façon à obtenir un point de détection fixe après la lentille tube. L'intensité collectée est alors mesurée pour chaque position du faisceau d'illumination dans l'échantillon, et l'image est ensuite reconstruite.

5.3.1.3 Limitations

Il existe deux limitations principales à la microscopie confocale : la vitesse d'acquisition et la profondeur de pénétration.

Si l'échantillon est suffisamment brillant, la cadence d'acquisition est limitée par la vitesse de balayage du faisceau lumineux. Grâce au développement de miroirs galvanométriques résonnantes, cette vitesse de balayage maximale est aujourd'hui de l'ordre de 20–40 Hz. A titre de comparaison, les microscopes

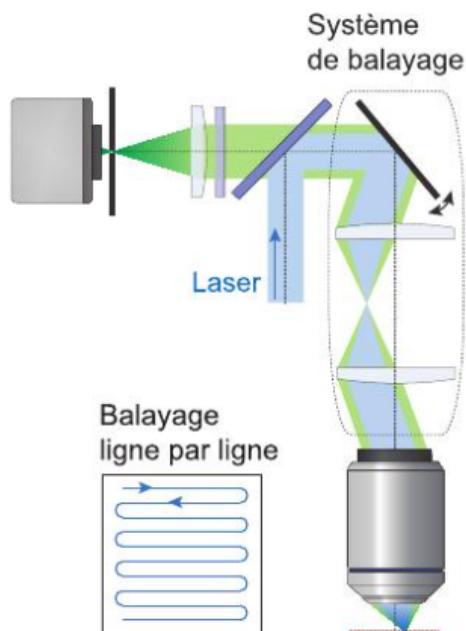


FIG. 5.14 – Implementation de la microscopie confocale.

plein champ peuvent acquérir des images à plusieurs centaines de hertz avec les caméras modernes – ce qui n'est intéressant bien sûr que pour des échantillons très brillants.

Une deuxième limitation importante de la microscopie confocale (qu'elle partage d'ailleurs avec la microscopie plein champ) est la faible robustesse à la diffusion, qui limite la profondeur maximale d'imagerie dans les tissus. En effet, le nombre de photons collectés diminue rapidement avec la profondeur d'imagerie dans un milieu diffusant : une partie des photons sont diffusés sur le trajet d'émission et n'atteignent pas le point focal de l'objectif, et de même une partie des photons émis sont diffusés dans l'échantillon et n'atteignent pas le détecteur. En pratique, cela limite la profondeur de pénétration à quelques dizaines de microns (voire une centaine de microns) au sein des tissus biologiques.

5.3.1.4 Une application en neurosciences

La microscopie confocale permet d'obtenir des images à haute résolution, et avec un bon rejet des photons émis hors du plan focal. L'une des applications en neurosciences est le traçage des connexions entre neurones. Il est possible de marquer différents neurones ou différents types de neurones avec des marqueurs fluorescents de différentes couleurs et de suivre les prolongements de ces neurones à travers différentes régions du cerveau, avec une précision égale à la résolution du microscope confocal, c'est-à-dire $< 300 \text{ nm}$. Pour s'affranchir de la diffusion, une méthode est de fixer le cerveau et d'en couper des tranches

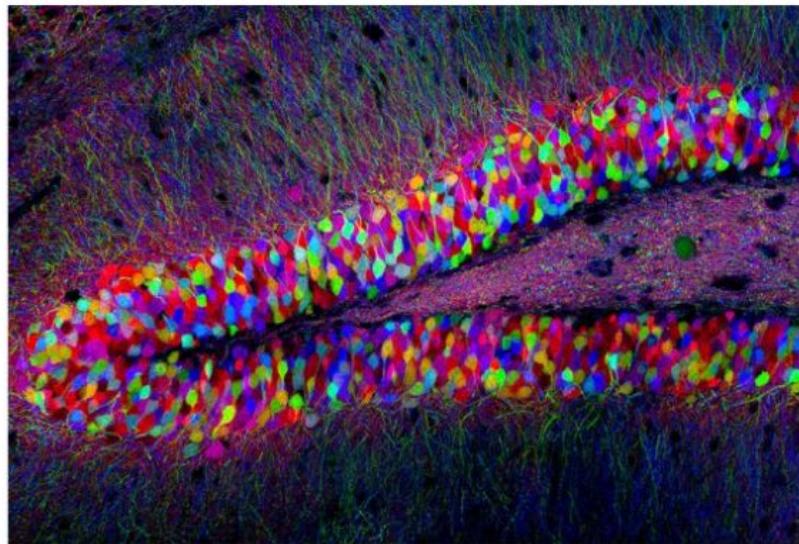


FIG. 5.15 – Image confocale d'une tranche de cerveau fixée d'une souris brainbow. Grâce à un marquage génétique, chaque neurone est marqué avec une couleur choisie aléatoirement parmi une palette d'une centaine de couleurs, ce qui permet de tracer ses prolongements (axones et dendrites) au sein de la tranche. La région imagée est là-encore l'hippocampe. Crédit : Image de Tamara Weissman. La souris Brainbow a été produite par Jean Livet, Joshua Sanes et Jeff Lichtman.

d'épaisseur inférieure à 100 microns, puis d'imager chaque tranche et (si l'on veut suivre les prolongements sur le cerveau entier) de recoller les images des différentes tranches. Des images aussi spectaculaires que celle de la figure 5.15 peuvent ainsi être obtenues.

5.3.2 Microscopie à deux photons

Depuis son invention en 1990, la microscopie à 2 photons a révolutionné l'imagerie des tissus biologiques et supplanté l'imagerie confocale pour de nombreuses applications, notamment grâce à sa robustesse à la diffusion. Dans cette partie, nous décrirons son principe de fonctionnement et nous montrerons pourquoi elle est bien plus robuste à la diffusion que les méthodes linéaires décrites jusqu'ici.

5.3.2.1 Principe de l'absorption à deux photons

La microscopie confocale et la microscopie plein champ reposent sur l'absorption d'un photon et l'émission d'un autre photon d'énergie plus faible (figure 5.1A). Ces techniques sont dites « linéaires », c'est-à-dire que l'intensité de fluorescence est proportionnelle à l'intensité du faisceau d'excitation.

Cependant, il existe un autre régime d'excitation des objets fluorescents pour lequel deux photons peuvent être absorbés simultanément (voir figure 5.16A). La désexcitation se produit là encore par l'émission d'un seul photon de fluorescence. Deux conditions doivent être remplies pour atteindre ce régime :

- avoir une intensité d'excitation élevée, de façon à maximiser la probabilité que deux photons arrivent simultanément sur l'objet fluorescent. Cela impose d'utiliser une source laser intense, pulsée, et dont on focalise le faisceau suivant une tâche de très petite dimension. Comme pour la microscopie confocale, la rayon de la tâche de focalisation est déterminée par la diffraction sur la pupille de l'objectif ($r = \lambda/2NA$).
- utiliser une longueur d'onde d'excitation environ deux fois plus élevée que celle utilisée en microscopie linéaire, correspondant à des photons deux fois moins énergétiques. Pour la GFP, la longueur d'onde d'excitation est donc dans le proche infrarouge autour de 900 nm.

Les techniques utilisant l'absorption à deux photons sont dites « non-linéaires », et l'intensité de fluorescence est alors proportionnelle au carré de l'intensité d'excitation.

5.3.2.2 Sectionnement optique et architecture du microscope à deux photons

Parce que la microscopie à deux photons est une technique non-linéaire, elle présente un effet de sectionnement optique inhérent. En effet, loin du plan focal le faisceau laser est très large ; l'intensité d'excitation en chaque point de l'espace est donc très faible, trop faible pour obtenir un effet non-linéaire d'absorption à 2 photons. Ainsi, l'émission de photons n'a lieu qu'à l'endroit où le faisceau est très intense, au point de focalisation. Cela est illustré par la photographie de la figure 5.16B, qui permet de comparer la quantité de photons émis en focalisant un laser visible (absorption à 1 photon) et infrarouge (absorption à 2 photons) dans un liquide fluorescent. Dans le premier cas, les photons fluorescents sont émis dans tout le cône d'illumination du faisceau. Dans le second cas, les photons fluorescents sont émis seulement au point focal.

D'un point de vue quantitatif, le processus d'absorption à 2 photons étant un phénomène quadratique, la PSF d'illumination est proportionnelle au carré de la distribution d'intensité du faisceau exciteur, c'est-à-dire au carré de la PSF d'illumination du microscope confocal. Elle est donc égale à la PSF totale du microscope confocal. Ainsi, même avec une PSF de détection uniforme (c'est-à-dire sans filtrage spatial sur le chemin de la détection), le sectionnement optique obtenu est le même que pour un microscope confocal. En particulier, l'intensité de fluorescence collectée dans le cas d'un plan fluorescent est inversement proportionnelle au carré de la distance entre le plan fluorescent et le plan focal objet de l'objectif.

Comme la partie illumination suffit à obtenir une propriété de sectionnement optique, la détection peut-être plus simple que pour la microscopie

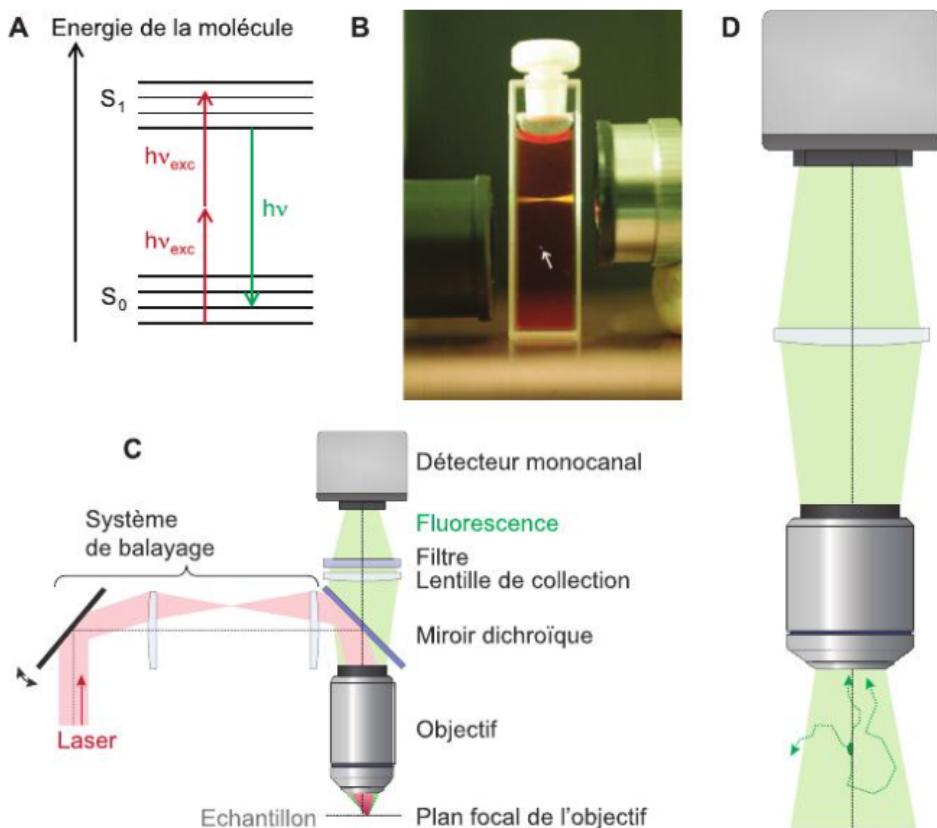


FIG. 5.16 – Microscopie à 2 photons. A) Principe de l'absorption à 2 photons. B) Des faisceaux laser dans le visible (en haut) et dans le proche infrarouge (en bas) sont focalisés dans une cuvette contenant des molécules fluorescentes. Avec l'absorption à 1 photon (en haut), la fluorescence est émise tout le long du trajet du faisceau laser, tandis qu'avec l'absorption à 2 photons (en bas), la fluorescence est confinée à un petit volume de taille micrométrique, indiqué par une flèche, situé au point focal de l'objectif. Crédit image : Brad Amos, LMB Cambridge. C) Architecture d'un microscope à 2 photons. La partie excitation est similaire à celle du microscope confocal (figure 5.11C) tandis que la détection se fait au plus près de la sortie de l'objectif en collectant le plus de photons possible sur un détecteur monocanal étendu. D) Détection des photons dans le cas de l'imagerie en milieu diffusant. Les photons diffusés sont collectés à condition qu'ils restent dans le cône de détection schématisé en vert.

confocale : l'idée est simplement de collecter tous les photons fluorescents qui parviennent jusqu'à la pupille du microscope et de les envoyer vers un détecteur étendu placé dans un plan image de la pupille (sans repasser par le dispositif de balayage pour gagner en efficacité de détection) (figure 5.16C). Le faisceau d'excitation est ensuite balayé dans l'échantillon au moyen d'un miroir rotatif galvanométrique placé sur le trajet du faisceau incident, et l'image est construite séquentiellement, comme pour la microscopie confocale.

5.3.2.3 Une technique bien armée pour combattre la diffusion

La microscopie à 2 photons est particulièrement bien adaptée à l'imagerie en milieu diffusant, et ce principalement pour trois raisons :

- La diffusion dans les tissus est fortement dépendante de la longueur d'onde. Pour imager les protéines fluorescentes décrites dans la première partie de ce chapitre, le faisceau d'excitation du microscope à 2 photons est dans le proche infrarouge : il est beaucoup moins diffusé qu'un faisceau d'excitation dans le visible, qui est la longueur d'onde utilisée pour la microscopie linéaire (confocale ou plein champ) ;
- Les photons du faisceau incident qui sont diffusés en dehors du volume d'excitation ne sont pas assez nombreux (à un endroit donné) pour permettre une excitation à 2 photons des objets fluorescents : ainsi seul les objets situés dans le volume focal sont excités efficacement ;
- La microscopie à 2 photons est peu sensible à la diffusion sur le trajet de la détection. En effet, comme on l'a vu, elle met en jeu un détecteur étendu placé dans un plan image de la pupille de l'objectif de façon à collecter tous les photons qui parviennent à cette pupille. Cela inclut des photons qui ont été diffusés dans l'échantillon. Même si leur trajet vers le détecteur n'a pas été balistique, ces photons viennent forcément du point imagé, car c'est le seul endroit où l'excitation est efficace (voir figure 5.16D).

Grâce à ces trois avantages combinés, la microscopie à 2 photons permet de réaliser des images jusqu'à des profondeurs de quelques centaines de microns dans les tissus. L'utilisation d'impulsions très intenses permet même de former des images d'objets situés à 1 mm de profondeur environ dans le cerveau. Comme nous l'avons indiqué en ouvrant cette section, c'est cette robustesse à la diffusion, et donc la capacité accrue d'imagerie en milieu diffusant qui fait la grande force et le grand succès de la microscopie à 2 photons pour l'imagerie biologique.

5.3.2.4 Limites et variations sur la microscopie à deux photons

Comme pour la microscopie confocale, dans son implémentation conventionnelle la microscopie à deux photons est limitée par une faible vitesse d'acquisition, notamment car l'image doit être construite point par point au moyen de dispositifs de balayage relativement lents. Pour améliorer cela, de nouveaux dispositifs de balayage ont vu le jour :

- des miroirs galvanométriques rapides, contrôlés autour de leur fréquence de résonance, permettent d'obtenir des images à des cadences de quelques dizaines de hertz ;
- des déflecteurs acousto-optiques, dont le principe repose sur la diffraction d'un faisceau laser sur un réseau créé par une onde acoustique, permettent d'aller pointer très rapidement quelques objets choisis dans l'échantillon, en trois dimensions. Cette méthode est utilisée pour mesurer d'activité neuronale de nombreuses cellules (>100) à haute cadence (à l'échelle de la milliseconde), grâce à des sondes sensibles au calcium.

Enfin, mentionnons qu'il est possible d'utiliser d'autres effets non-linéaires que l'absorption à 2 photons pour exciter les molécules fluorescentes. Par exemple, l'absorption à 3 photons est une technique prometteuse pour imager les tissus à des profondeurs encore plus élevées, supérieures au millimètre.

5.3.2.5 Une application de la microscopie à deux photons en neurosciences

L'une des applications principales de la microscopie à 2 photons en neurosciences est l'imagerie de l'activité des neurones, qui peut être réalisée chez un animal éveillé et en comportement pour chercher à établir les bases neuronales de la perception sensorielle, de la mémoire, ou des comportements. Deux types de configurations expérimentales ont été explorées :

- Une première configuration consiste à maintenir la souris éveillée et tête fixée sous le microscope, comme le montre la figure 5.17A. Des systèmes de réalité virtuelle ont été développés pour effectuer des stimulations sensorielles de l'animal (visuelles, somatosensorielles...) ou pour le faire naviguer le long d'une piste virtuelle, comme c'est le cas sur la figure 5.17B. La microscopie à 2 photons permet par exemple d'enregistrer des images de haute qualité dans l'hippocampe de souris dont les neurones expriment l'indicateur calcique GCaMP3 (figure 5.17C). Les cellules indiquées en rouge sont des cellules de lieu qui codent pour une position précise de la piste virtuelle (figure 5.17D) ;
- La seconde configuration consiste à développer un microscope miniature à 2 photons, pour effectuer des enregistrements chez un animal libre de se mouvoir. Cette configuration permet d'accéder à une palette de comportements beaucoup plus large, mais la miniaturisation d'une technique complexe comme la microscopie à deux photons représente un défi considérable. La figure 5.17E-F montre la première réalisation chez le rat, en 2009. Il a fallu attendre presque 10 ans de plus pour voir apparaître les premières démonstrations d'imagerie de l'activité neuronale par microscopie à 2 photons chez la souris non contrainte. En effet c'était un véritable tour de force que de miniaturiser un microscope à 2 photons pour qu'il ne pèse que 2 grammes !

5.4 Techniques de microscopie rapides à sectionnement optique

Comme on l'a vu dans le chapitre précédent, la principale limitation des microscopies à balayage telles que la microscopie confocale et la microscopie à 2 photons est la vitesse d'acquisition. C'est une limite intrinsèque, qui vient du fait que l'acquisition de l'image se fait de façon séquentielle : il faut rester suffisamment longtemps sur chaque point pour collecter assez de photons (et ainsi obtenir un bon rapport signal sur bruit) et il faut se déplacer d'un

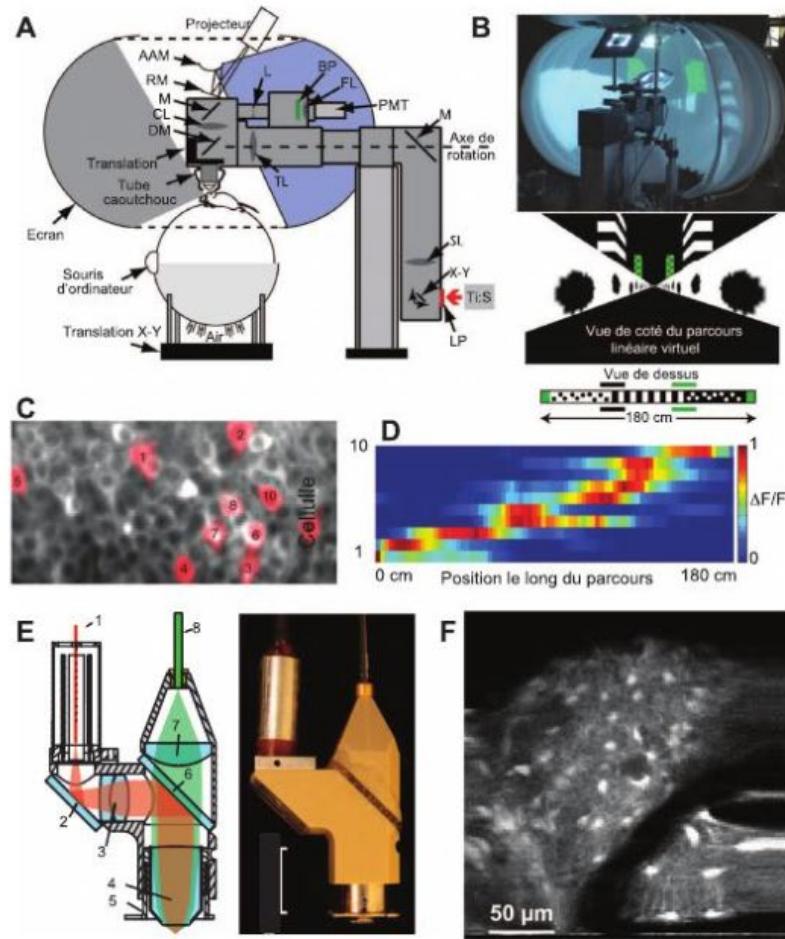


FIG. 5.17 – Microscopie par excitation à 2 photons chez le rongeur éveillé et tête fixée (A-D) ou libre de se mouvoir (E-F). A) Schéma d'un microscope à 2 photons permettant de réaliser des images chez une souris dont la tête est fixée au statif du microscope et qui peut courir sur une boule de polystyrène. B) Un système de réalité virtuelle permet de projeter une piste linéaire pour étudier les cellules de lieu. C) Image à 2 photons de neurones de l'hippocampe exprimant GCaMP3. Les neurones actifs sont représentés en rouge. D) Activité de 10 neurones de l'image C en fonction de la position de la souris le long de la piste virtuelle. Ces neurones sont des cellules de lieu codant pour des régions différentes de la piste. Crédit : adapté de Dombeck et al. *Nature Neuroscience* 13, 1433–1440 (2010). E) Microscope à 2 photons miniature destiné à être fixé sur la tête d'un rat en comportement libre. 1, 8 : fibres optiques ; 2 : miroir ; 3, 7 : lentilles ; 4 : micro-objectif ; 5 : dispositif de focalisation ; 6 : miroir dichroïque. F) Image de neurones du cortex visuel exprimant un indicateur calcique, enregistrée chez un rat en comportement libre. Crédit : adapté de Sawinski et al., *PNAS* 106 : 19557–19562 (2009)

point à l'autre de l'échantillon pour construire l'image. Ainsi, un axe de recherche à consisté à développer des techniques plus rapides, pour lesquelles la fluorescence est collectée de façon parallèle en plusieurs points, tout en

conservant une propriété de sectionnement optique. Nous allons présenter dans ce chapitre deux méthodes de ce type parmi les plus utilisées en biologie : la microscopie à disque rotatif et la microscopie à feuille de lumière.

5.4.1 Microscopie confocale à disque rotatif

La microscopie confocale à disque rotatif (*spinning disk* en anglais) s'inspire du même principe que la microscopie confocale à balayage, mais en parallélisant le processus sur plusieurs points d'illumination et de détection pour améliorer la vitesse d'acquisition. Le schéma du microscope est représenté sur la figure 5.18A. Le faisceau laser exciteur passe par un système optique constitué d'un disque de microlentilles et d'un disque de trous de filtrage : chaque micro-lentille focalise le faisceau sur le trou de filtrage correspondant. Le faisceau est ainsi focalisé en une multitude de points lumineux. La matrice de trous de filtrage est imagée dans l'échantillon, au plan focal de l'objectif de microscope, ce qui permet ainsi d'illuminer l'échantillon par une matrice de points lumineux. La fluorescence émise par l'échantillon suit le même trajet dans l'autre sens et repasse par le disque de trous de filtrage (on retrouve l'effet *con-focal*). Elle est ensuite séparée du faisceau d'excitation par un miroir dichroïque et imagée sur une caméra. Les deux disques subissent une rotation rapide de façon à ce que le faisceau d'illumination couvre toute la surface de l'échantillon pendant l'acquisition d'une image par la caméra.

Grâce à la parallélisation du processus d'acquisition, les images peuvent être enregistrées à des cadences au moins 10 fois plus élevées qu'avec la microscopie confocale traditionnelle (100-1000 Hz). Le sectionnement optique est similaire, quoique légèrement dégradé à cause de la diaphonie entre trous de filtrage voisins. Sans rentrer dans les détails, si l'on reprend l'expérience du plan fluorescent, on obtient pour la microscopie confocale à disque rotatif un faible signal rémanent indépendant de la position du plan fluorescent lorsque celui-ci est loin du plan focal (figure 5.18B). Ainsi, par rapport à la microscopie confocale classique, la microscopie confocale à disque rotatif est moins bien adaptée aux échantillons très épais, puisque les objets fluorescents situés loin du plan focal apportent une contribution significative au signal collecté.

5.4.2 Microscopie à feuille de lumière

5.4.2.1 Principe et architecture du microscope

Comment combiner la rapidité de la microscopie plein champ avec un sectionnement optique aussi performant que celui de la microscopie confocale ? Une réponse a été donnée par l'invention de la microscopie à feuille de lumière, ou ultramicroscopie, dont le principe est relativement simple. Il s'agit d'exciter l'échantillon selon une feuille de lumière, c'est-à-dire d'illuminer uniquement le plan focal de l'objectif. Comme les plans hors focus ne sont pas illuminés, ils n'émettent pas de photons fluorescents : c'est donc une façon extrêmement efficace d'obtenir une propriété de sectionnement optique.

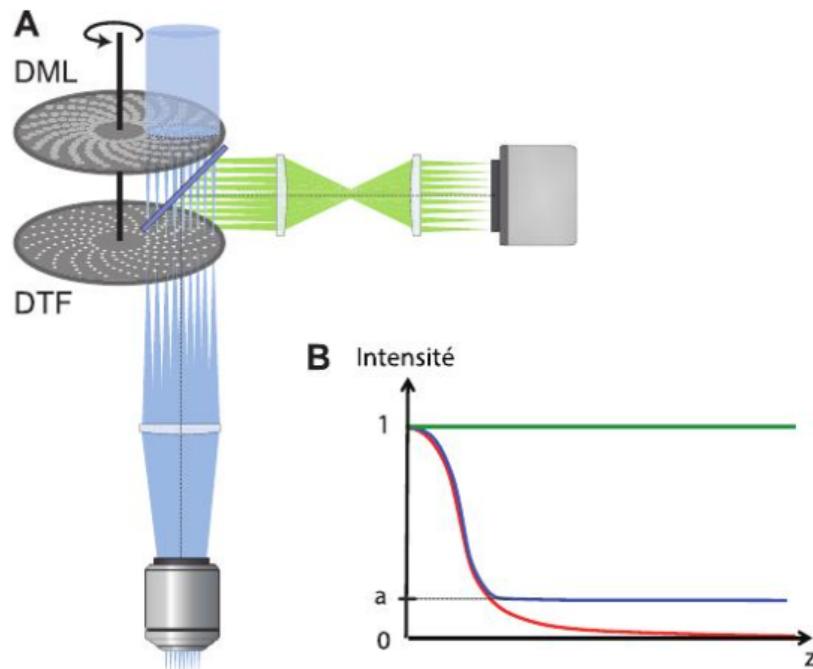


FIG. 5.18 – Microscopie confocale à disque rotatif. A) Schéma de principe du microscope. DML. Disque de micro-lentilles. DTF. Disque de trous de filtrage. B) Intensité détectée avec la microscopie plein champ (vert), la microscopie confocale standard (rouge), et la microscopie confocale à disque rotatif (bleu) dans le cas d'un plan fluorescent, en fonction de la distance z entre le plan focal et le plan fluorescent. Pour la microscopie plein champ, le signal est constant, correspondant à une absence de sectionnement optique. Pour la microscopie confocale classique, le signal décroît en $1/z^2$. La microscopie confocale à disque rotatif correspond à une situation intermédiaire, avec une décroissance du signal similaire au microscope confocal classique pour un plan proche du plan focal, et un signal indépendant de z pour un plan éloigné du plan focal. Ce signal est égal à la densité des trous a dans la matrice des trous de filtrage (c'est-à-dire le rapport entre surface couverte par les trous et la surface totale de la matrice). Il s'élève à quelques pourcents.

Comment réalise-t-on cette illumination planaire ? Comme le montre la figure 5.19, l'illumination se fait perpendiculairement à la détection au moyen d'un deuxième objectif. Cet objectif, à faible ouverture numérique, projette un faisceau se propageant dans le plan focal de l'objectif de détection, décrivant ainsi une ligne d'illumination. Cette ligne est ensuite déplacée latéralement à grande vitesse au moyen d'un système de balayage placé en amont de l'objectif, de façon à illuminer tout le plan focal. Alternativement, l'échantillon peut être illuminé directement suivant un plan en focalisant un faisceau laser par une lentille cylindrique (focalisation dans une seule direction). La détection est similaire à celle d'un microscope plein champ : les photons émis dans le plan focal de l'objectif de détection sont collectés par cet objectif et imaginés sur une caméra rapide.

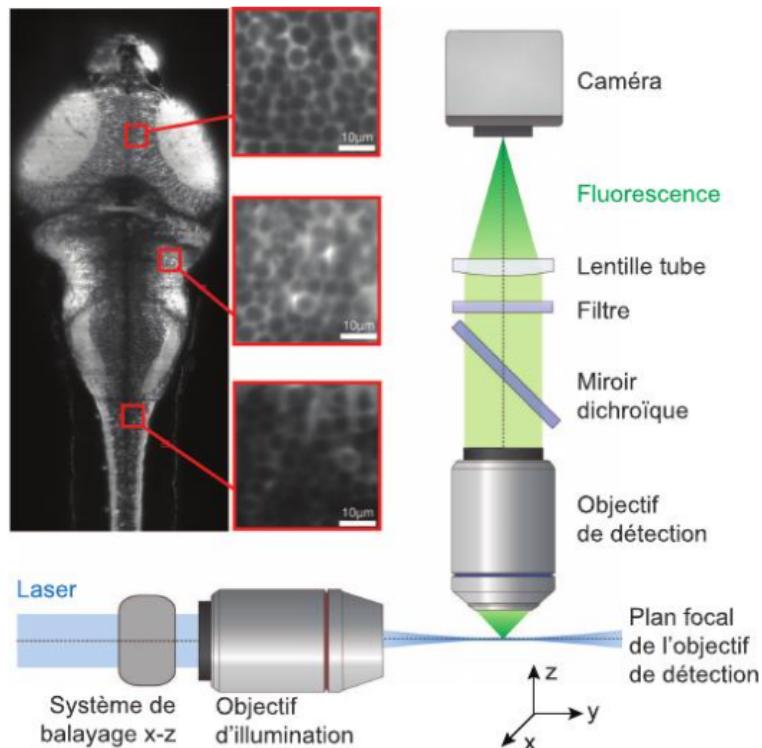


FIG. 5.19 – Microscopie à feuille de lumière. Schéma du microscope et image d'une larve de poisson zèbre dont les neurones expriment GCaMP. L'activité de 5000 neurones peut ainsi être imagerée simultanément, avec une résolution cellulaire. En insert, des zooms sur différentes parties de l'image permettent de voir les neurones individuels. Crédit : Panier et al., Frontiers in Neural Circuits 7 : 65 (2013)

5.4.2.2 Avantages

La microscopie à feuille de lumière combine les avantages de la microscopie confocale et de la microscopie plein champ : c'est une technique rapide qui présente un très bon sectionnement optique. De plus, elle possède un avantage supplémentaire pour l'imagerie des échantillons biologiques : puisque seul le plan focal est illuminé, la phototoxicité (dégradation de l'échantillon suite à une illumination prolongée) ou le photoblanchissement (diminution de la fluorescence de l'échantillon due à une illumination prolongée) sont fortement réduits. Il est ainsi possible d'imager le même échantillon tridimensionnel pendant plusieurs heures.

5.4.2.3 Limitations et quelques solutions pour les dépasser

La difficulté principale de la microscopie à feuille de lumière est dans la réalisation même de la feuille de lumière. Considérons le trajet du faisceau d'éclairage qui doit produire cette feuille de lumière et notons NA_{ill} l'ouverture numérique de ce faisceau. On rappelle que le diamètre du faisceau au point

focal est limité par la diffraction à environ λ/NA_{ill} , et que le faisceau reste focalisé sur une extension axiale d'environ $2z_0 = \lambda/NA_{\text{ill}}^2$ (correspondant à l'extension axiale de la PSF du microscope plein champ). En dehors de cette région le faisceau diverge dans un cône de demi-angle NA_{ill} . Ainsi, il existe un compromis entre 2 grandeurs caractéristiques du microscope :

- la résolution axiale, égale au diamètre du faisceau d'illumination au plan focal, est d'autant plus petite que NA_{ill} est grand ;
- le champ de vue du microscope, correspondant à la région sur laquelle ce faisceau d'illumination reste bien focalisé, est d'autant plus grand que NA_{ill} est petit.

Une solution pour améliorer ce compromis consiste à utiliser deux faisceaux excitateurs contrapropagatifs pour exciter les deux cotés du champ de vue, ce qui est réalisé en positionnant en deuxième objectif d'illumination symétrique au premier par rapport à l'échantillon. De plus, de nombreuses techniques de mise en forme de faisceau ont été développées pour lever partiellement cette contrainte et obtenir un faisceau d'illumination de faible taille sur des distances plus élevées. Notons également que dans le cas de l'imagerie des tissus, la diffusion du laser exciteur conduit également à l'augmentation de sa taille, et donc à une perte de résolution axiale de la technique. Pour lutter contre cet effet, il est possible d'illuminer l'échantillon avec un faisceau infrarouge impulsif et réaliser une excitation à 2 photons.

Pour finir, une autre limitation importante de la microscopie à feuille de lumière est sa géométrie relativement encombrante (avec deux objectifs disposés à 90 degrés). Ainsi, la technique est surtout adaptée à l'imagerie de petits animaux (embryons, larves de poissons zèbres) ou des tissus fixés.

5.4.2.4 Applications de la microscopie à feuille de lumière en neurosciences

En neurosciences, il existe deux grands domaines d'application de la microscopie à feuille de lumière :

- L'imagerie de cerveaux transparisés. Comme nous l'avons déjà évoqué à plusieurs reprises, l'une des grandes limitations de l'imagerie optique des tissus est la diffusion de la lumière. Depuis quelques années, de nombreux protocoles ont été mis au point pour rendre les cerveaux transparents (*post mortem*). Ces techniques sont compatibles avec l'expression de marqueurs fluorescents, que l'on peut cibler à des types cellulaires bien précis. Ainsi, cela rend possible l'imagerie morphologique de ces neurones et de leurs prolongements dans des cerveaux de rongeurs entiers. Ces expériences permettent de mieux comprendre les connexions entre différentes aires du cerveau, à l'échelle cellulaire. De par sa rapidité et son sectionnement optique intrinsèque, l'imagerie par feuille de lumière est la technique idéale pour imager ces échantillons transparisés.
- L'imagerie à feuille de lumière est également une technique de choix pour effectuer l'imagerie fonctionnelle grand champ chez des petits animaux

transparents tels que la larve de poisson zèbre. Un exemple d'image est montré sur la figure 5.19. Il est possible d'enregistrer l'activité de tous les neurones du cerveau à une cadence de quelques hertz.

5.5 Conclusion

Le développement de nouvelles méthodes d'imagerie de fluorescence est toujours un domaine en plein essor. Une communauté importante de chercheurs continue à mettre au point de nouvelles techniques et à apporter des raffinements aux techniques existantes. Ces développements sont motivés par les applications en biologie, qui nécessitent de repousser toujours plus loin les limites des techniques d'imagerie. Pour les neurosciences, par exemple, ces limites doivent encore être repoussées dans plusieurs directions :

(1) **Augmenter la profondeur maximale d'imagerie en milieu diffusant.** Les techniques d'imagerie les plus robustes à la diffusion (microscopie à 2 et 3 photons) permettent d'atteindre une profondeur de l'ordre du millimètre, c'est-à-dire d'imager toute l'épaisseur de cortex chez le rongeur. Cependant, 90% du volume du cerveau du rongeur reste inaccessible par ces techniques. Pour observer des régions plus profondes, deux alternatives sont envisagées. La première consiste à planter des microlentilles en forme d'aiguille en profondeur dans le cerveau et d'utiliser ces micro-lentilles comme des relais entre le plan focal du microscope, situé à l'extérieur du cerveau, et une région en profondeur dans le cerveau. La seconde consiste à imager directement à travers ces milieux diffusants, comme présenté dans le chapitre 3;

(2) **Augmenter la taille du champ de vue.** Le cerveau est l'organe le plus complexe, et le traitement des informations implique l'activité concrète de nombreuses régions. Ainsi, l'un des axes de développement consiste à agrandir le champ de vue des microscopes pour atteindre des tailles de plusieurs millimètres, de façon à enregistrer simultanément l'activité de neurones dans plusieurs régions du cerveau ;

(3) **Augmenter la vitesse d'acquisition.** La communication entre neurones s'effectue à une échelle de temps de la milliseconde. Pourtant peu de techniques permettent aujourd'hui de réaliser des acquisitions aussi rapides, et de collecter suffisamment de photons pendant des temps aussi courts. Ainsi, comme on l'a montré partiellement dans ce chapitre, de nombreux efforts sont réalisés pour accélérer les techniques, mais aussi pour développer des sondes d'activité plus rapides et plus sensibles ;

(4) **Améliorer la résolution spatiale.** Les techniques présentées dans ce chapitre présentent une résolution spatiale limitée par la diffraction de la lumière à quelques centaines de nanomètres. Or de nombreux phénomènes biologiques se passent à des échelles beaucoup plus petites. Depuis une vingtaine d'années, des chercheurs ont montré que cette limite de diffraction pouvait être repoussée. Des techniques dites de « super-résolution » ont vu le jour, permettant d'obtenir une résolution latérale à l'échelle de la dizaine de

nanomètres. Le développement de ces techniques a valu le prix Nobel de chimie à E. Betzig, M. Moerner et S. Hell en 2014. Ces méthodes ont été abordées brièvement dans le chapitre introductif, et pour plus de détails le lecteur pourra se référer au chapitre 4 du livre « Physique et biologie : De la molécule au vivant »².

Pour finir, il existe aujourd’hui une immense variété de techniques d’imagerie de fluorescence, dont nous n’avons présenté que les principales. Ces techniques sont complémentaires, et les biologistes ont à leur disposition une palette importante de méthodes, dont les performances ont été grandement améliorées au cours de ces dernières années. Ainsi, en neurosciences, les méthodes d’imagerie optique viennent apporter des informations complémentaires aux méthodes plus traditionnelles d’électrophysiologie, en permettant l’enregistrement et la perturbation de milliers de neurones simultanément, à une échelle cellulaire, chez des animaux en comportement. Ces progrès technologiques ouvrent la voie à de nombreuses études visant à comprendre les liens entre l’activité à l’échelle cellulaire et les comportements, la formation de la mémoire, ou la perception sensorielle.

Bibliographie

Articles de revue

Pour approfondir les concepts introduits dans ce chapitre, nous recommandons la lecture d’un numéro spécial de la revue *Nature Methods* sur l’imagerie de fluorescence intitulé « Focus on fluorescence imaging : Principles and practice of microscope techniques » (volume 2, numéro 12, décembre 2005). Ce numéro spécial inclut en particulier les articles suivants :

Jeff Lichtman et José-Angel Conchello, « Fluorescence microscopy », p 910.

José-Angel Conchello et Jeff Lichtman, « Optical sectioning microscopy », p 920.

Fritjof Helmchen et Winfried Denk, « Deep tissue two-photon microscopy », p 932.

Benjamin Flusberg, Eric Cocker, Wibool Piyawattanametha, Juergen Jung, Eunice Cheung et Mark Schnitzer, « Fiber-optic fluorescence imaging », p 941.

Autres articles mentionnés dans ce chapitre

Winfried Denk, James H. Strickler and Watt W. Webb, « Two-Photon Laser Scanning Fluorescence Microscopy », *Science* 248 : 73–76 (1990)

2. « Physique et biologie – De la molécule au vivant », J.-F. Allemand et P. Desbiolles, EDP Sciences, ISBN : 978-2-7598-0677-5.

- Juergen Sawinski, Damian J. Wallace, David S. Greenberg, Silvie Grossmann, Winfried Denk and Jason N. D. Kerr, « Visually evoked activity in cortical cells imaged in freely moving animals », PNAS 106 : 9557–19562 (2009)
- Daniel A Dombeck, Christopher D Harvey, Lin Tian, Loren L Looger and David W Tank, « Functional imaging of hippocampal place cells at cellular resolution during virtual navigation », Nature Neurosciences 13 : 1433–1443 (2010)
- Kunal K Ghosh, Laurie D Burns, Eric D Cocker, Axel Nimmerjahn, Yaniv Ziv, Abbas El Gamal and Mark J Schnitzer, « Miniaturized integration of a fluorescence microscope », Nature Methods 8 : 871–882 (2011)
- Tsai-Wen Chen, Trevor J. Wardill, Yi Sun, Stefan R. Pulver, Sabine L. Renninger, Amy Baohan, Eric R. Schreiter, Rex A. Kerr, Michael B. Orger, Vivek Jayaraman, Loren L. Looger, Karel Svoboda and Douglas S. Kim « Ultrasensitive fluorescent proteins for imaging neuronal activity », Nature 499 : 295–302 (2013)
- Thomas Panier, Sebastian A. Romano, Raphael Olive, Thomas Pietri, German Sumbre, Raphael Candelier and Georges Debrégeas, « Fast functional imaging of multiple brain regions in intact zebrafish larvae using Selective Plane Illumination Microscopy », Frontiers in Neural Circuits 7 : 65 (2013)
- Weijian Zong, Runlong Wu, Mingli Li, Yanhui Hu, Yijun Li, Jinghang Li, Hao Rong, Haitao Wu, Yangyang Xu, Yang Lu, Hongbo Jia, Ming Fan, Zhuan Zhou, Yunfeng Zhang, Aimin Wang, Liangyi Chen and Heping Cheng « Fast high-resolution miniature two-photon microscopy for brain imaging in freely behaving mice », Nature Methods 14 : 713–719 (2017).

Conclusion

Nous avons tenté de présenter, dans ces quelques chapitres, les concepts fondamentaux permettant d'appréhender les principaux enjeux de l'imagerie optique : résolution et diffraction, holographie, compensation des aberrations et de la diffusion de la lumière, sectionnement optique. Nous avons également illustré ces concepts par différentes applications : microscopie pour les neurosciences, astronomie, suivi de particules, etc.

L'imagerie optique est cependant un domaine très large, dont il ne nous a été possible de présenter que quelques aspects. En particulier, l'optique pour l'imagerie du vivant comprend de nombreuses techniques qu'il ne nous a pas été possible d'aborder par manque de place, dont les applications s'étendent de la compréhension des mécanismes biologiques fondamentaux (par tomographie diffuse, microscopie à super-résolution, ...) jusqu'à des moyens de diagnostic en médecine (suivi opératoire, analyse de biopsies).

Les concepts présentés ici sont également utiles pour d'autres techniques d'imagerie. En particulier, l'imagerie ultrasonore (l'échographie que nous connaissons tous) utilise des ondes mécaniques se propageant dans nos tissus, et beaucoup des concepts développés ici pour les ondes lumineuses sont donc également valables pour les ondes acoustiques. La différence principale est la résolution, bien inférieure, puisque la longueur d'onde des ultrasons dans le domaine médical est plutôt proche du millimètre et non du micromètre. Néanmoins, si l'optique donne accès à la résolution cellulaire, cela se fait en général sur de tous petits champs de vue (quelques millimètres au maximum), alors que l'acoustique permet par contre d'imager des organes entiers. Les ultrasons donnent également accès à d'autres informations que l'optique, plutôt liées aux propriétés mécaniques des tissus. Ces informations sont utiles pour la détection de cancers par exemple ou l'observation du mouvement des tissus (activité cardiaque par exemple).

Enfin, il est intéressant de noter que la combinaison de plusieurs techniques permet parfois d'obtenir des résultats étonnantes : ainsi l'imagerie photoacoustique, qui combine excitation optique et détection acoustique, permet de détecter une absorption optique (donnant ainsi accès à la spécificité de l'optique) tout en tirant partie de la grande profondeur de pénétration accessible en acoustique. Cette méthode est ainsi particulièrement utile pour suivre la vascularisation des tissus : le sang absorbant fortement la lumière, on peut

ainsi reconstruire le réseau sanguin, qui est normalement invisible aux ultrasons. Elle permet également de détecter des cancers normalement invisibles en acoustique grâce à des marqueurs absorbant la lumière. La photoacoustique est ainsi très utilisée pour l'imagerie biomédicale.

Enfin, on ne peut pas conclure ce livre sans mentionner un domaine important de l'imagerie optique du vivant que nous avons à peine esquissé et qui mériterait à lui seul un ouvrage : l'ophtalmologie. L'optique adaptative a permis une révolution dans l'observation de la rétine, permettant de compenser les imperfections du segment antérieur pour discerner un par un les photorécepteurs ou les microvaisseaux sanguins. De même, la tomographie de cohérence optique, technique récente inventée seulement à la fin des années 1990, offre un sectionnement optique permettant une imagerie tridimensionnelle rapide de la rétine. Cette approche a été révolutionnaire pour le diagnostic de nombreuses maladies de l'œil (comme la dégénérescence maculaire liée à l'âge), elle est maintenant un instrument standard de diagnostic à l'hôpital et même dans les cabinets d'ophtalmologie. Cet exemple montre comment les avancées récentes de l'optique, de par la richesse des informations nouvelles qu'elles apportent, peuvent très rapidement avoir un impact fort en médecine. De même, la révolution optogénétique, que nous avons abordée, permettant d'imager avec la lumière l'activité du cerveau, mais aussi d'activer un à un des neurones, est en train de révolutionner les neurosciences fondamentales. L'optogénétique reste néanmoins essentiellement limitée à l'expérimentation sur les organismes simples ou le petit animal, et reste très difficilement transposable à l'être humain ou à la médecine - même si quelques exemples commencent à voir le jour.

En guise de conclusion, nous avons retracé ici quelques développements récents de l'imagerie optique pour le vivant, mais le domaine est en pleine effervescence, tant en termes de nouvelles techniques, qu'en termes d'applications. Nous espérons avoir donné au lecteur quelques bases de compréhension, et éveillé sa curiosité pour suivre les développements actuels et futurs du domaine.