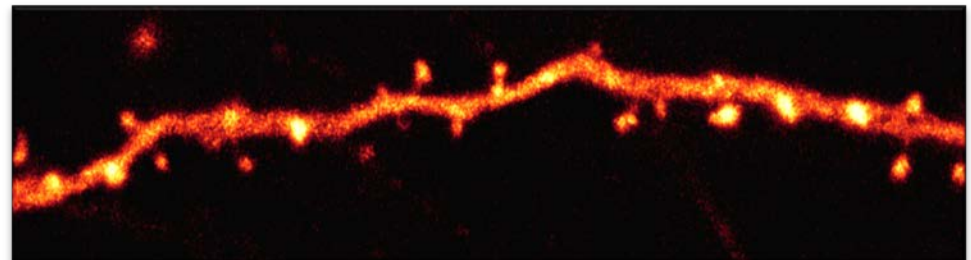
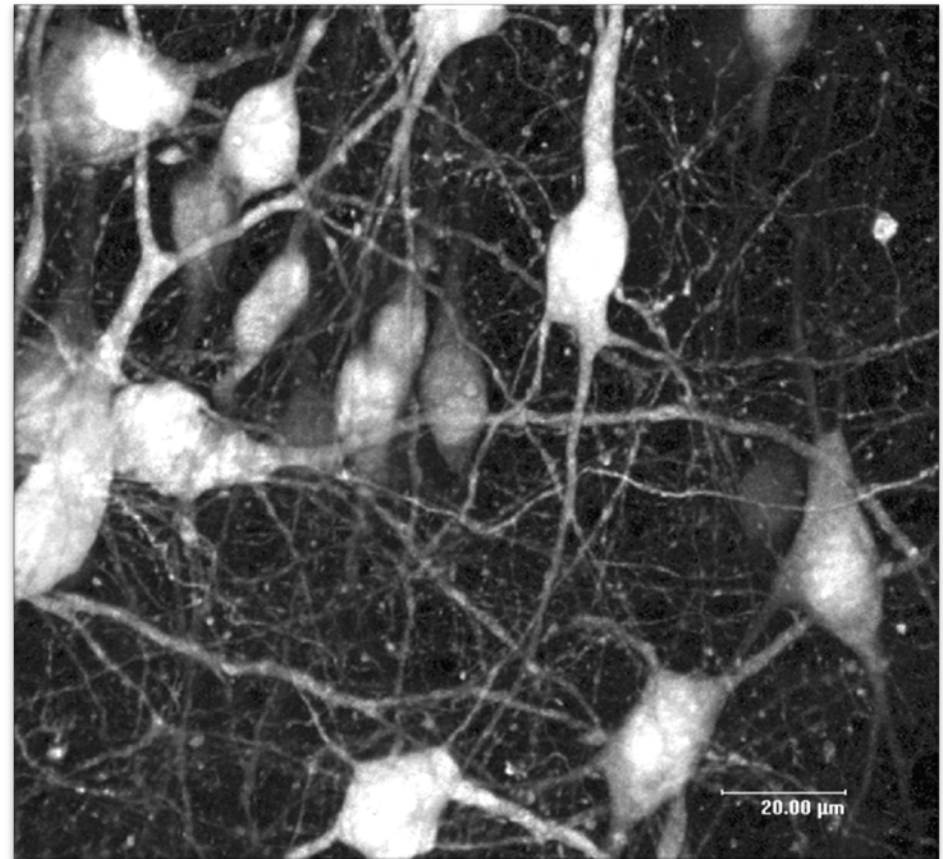
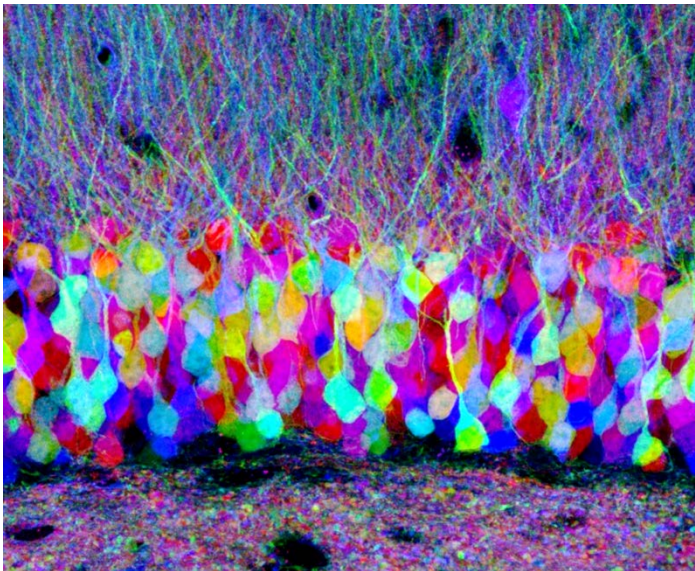
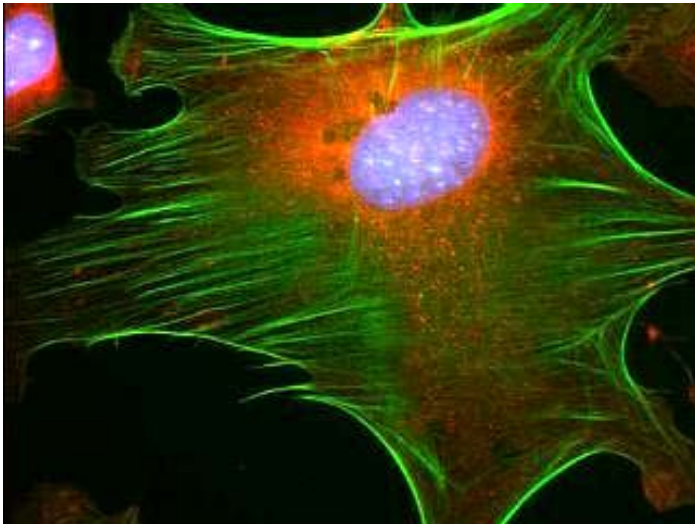


Microscopie de fluorescence

La microscopie pour débutants (ou pas)
Partie 2

François MICHEL PhD

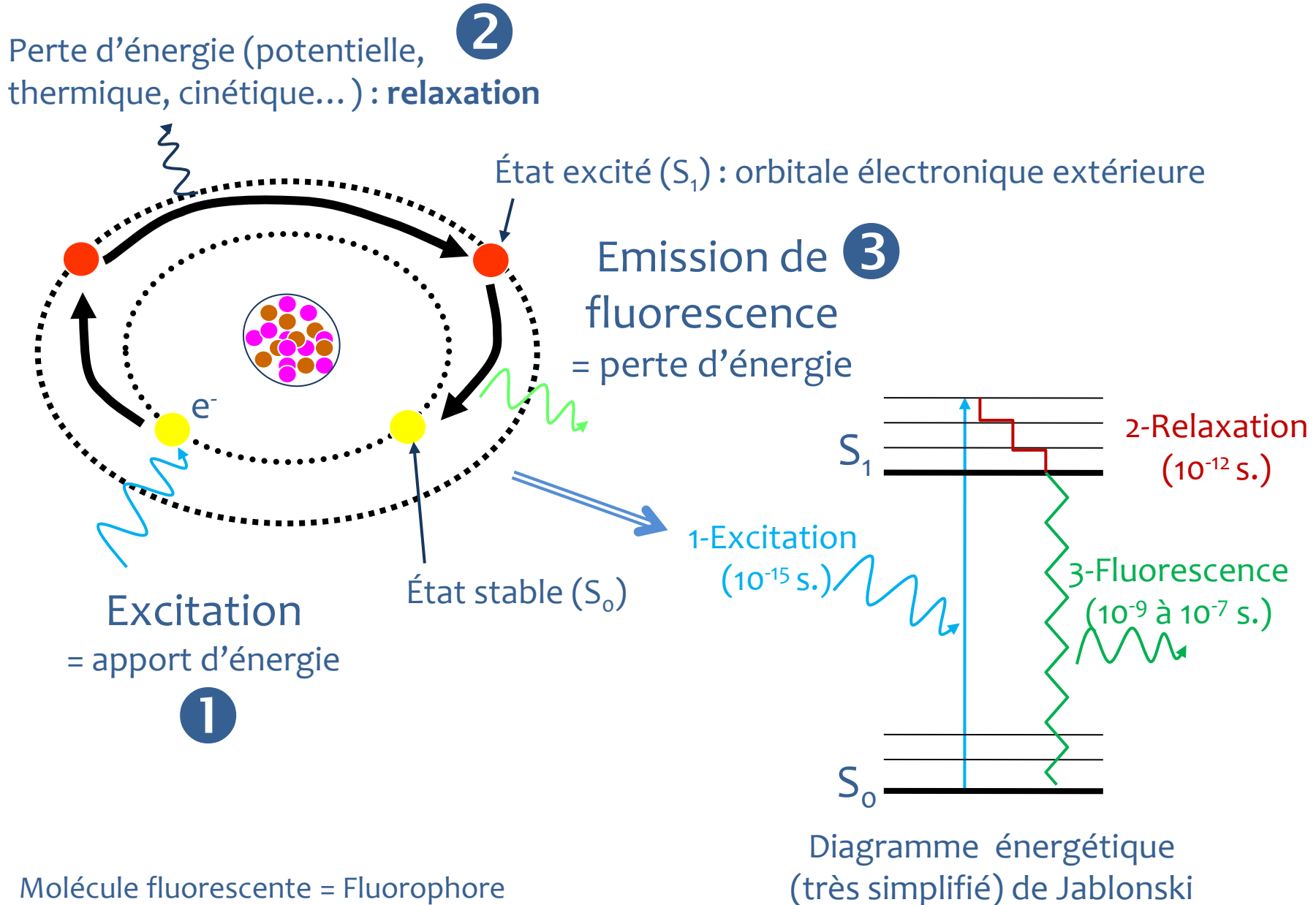
Quelques images en fluorescence



Ce qui vous attend (encore)

- Fluorescence ??
- Microscopie à épi-fluorescence
- Entrons dans la 3^{ème} dimension
- Imagerie multiphoton

Principes de la fluorescence

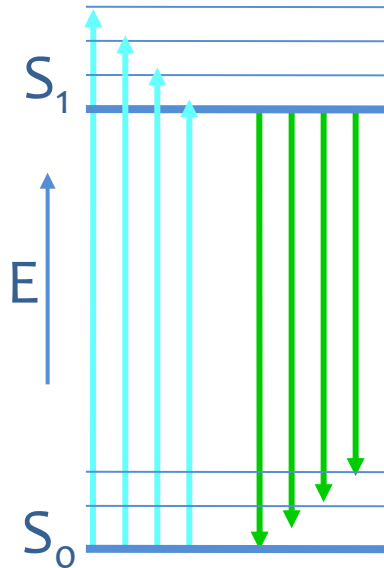
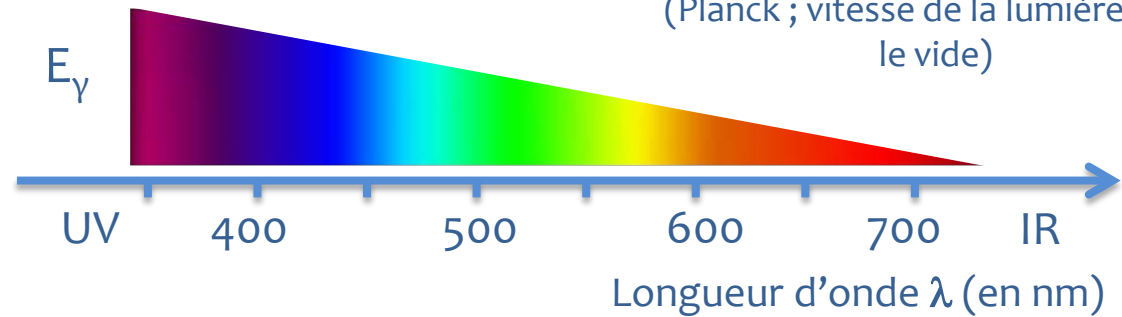


Principes de la fluorescence

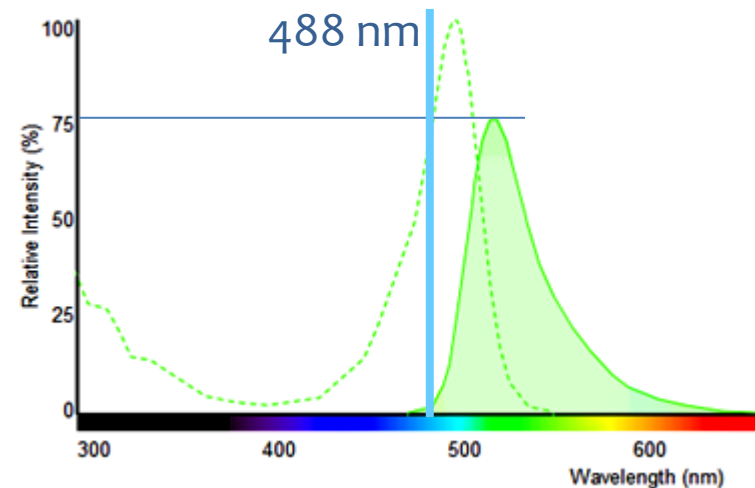
L'excitation et l'émission sont des phénomènes quantiques : la molécule accepte une certaine quantité d'énergie, ni trop ni trop peu, pour être excitée et réémet cette énergie autour d'une valeur privilégiée (pic d'émission).

L'énergie d'un photon est : $E_\gamma = hc/\lambda$

Où h et c sont des constantes
(Planck ; vitesse de la lumière dans le vide)



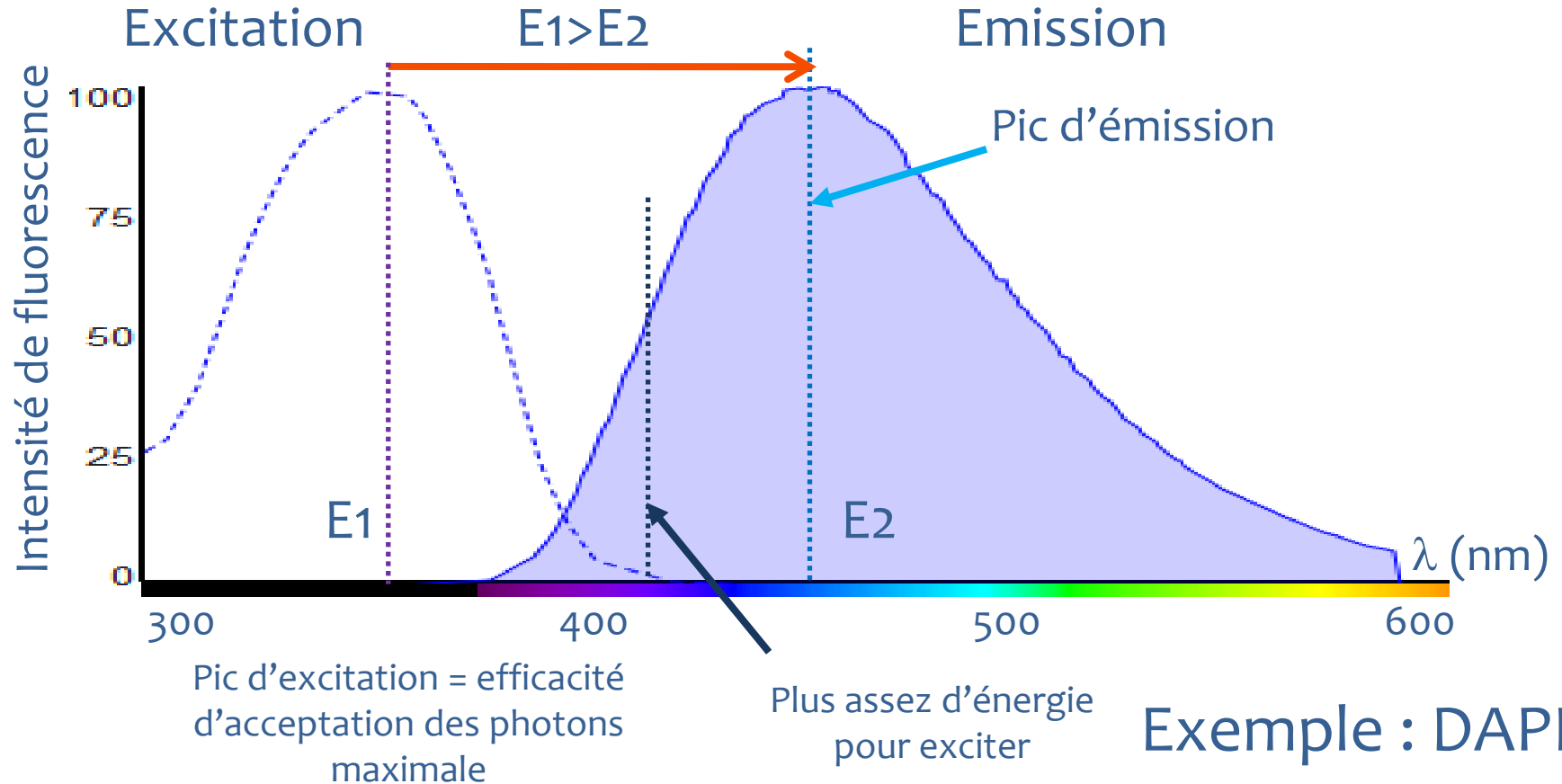
Les différents états vibrationnels et rotationnels des niveaux d'énergie se reflètent dans les spectres d'émission et d'excitation.



Principes de la fluorescence

Chaque molécule fluorescente a des spectres d'excitation et d'émission qui lui sont propres (influencés par la structure chimique de la molécule et les conditions physique (pH, T...)).

Perte d'énergie entre excitation et émission
Décalage vers le rouge : (Stokes shift)

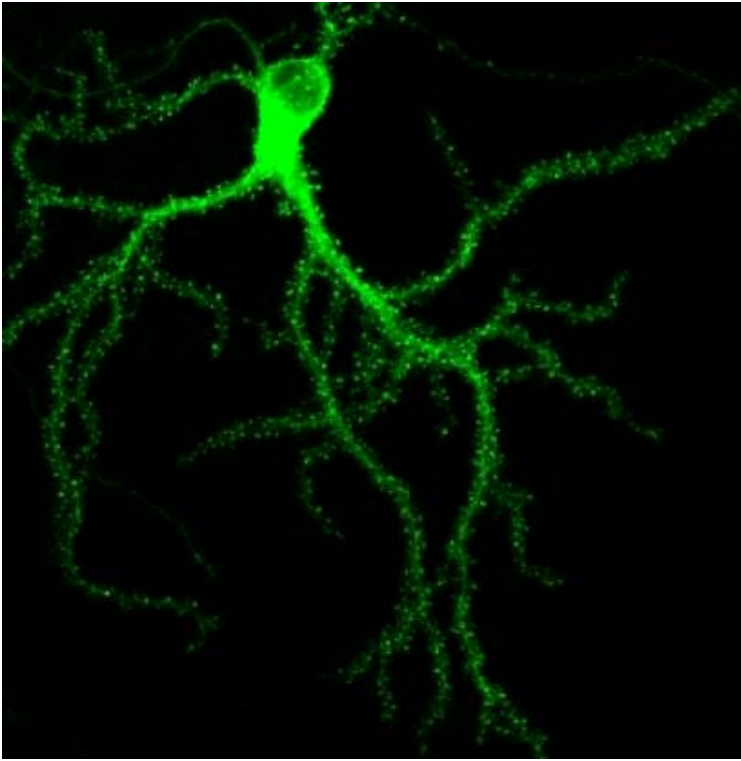


Principes de la fluorescence

L'intérêt majeur de la fluorescence réside dans son rapport signal sur bruit très favorable.

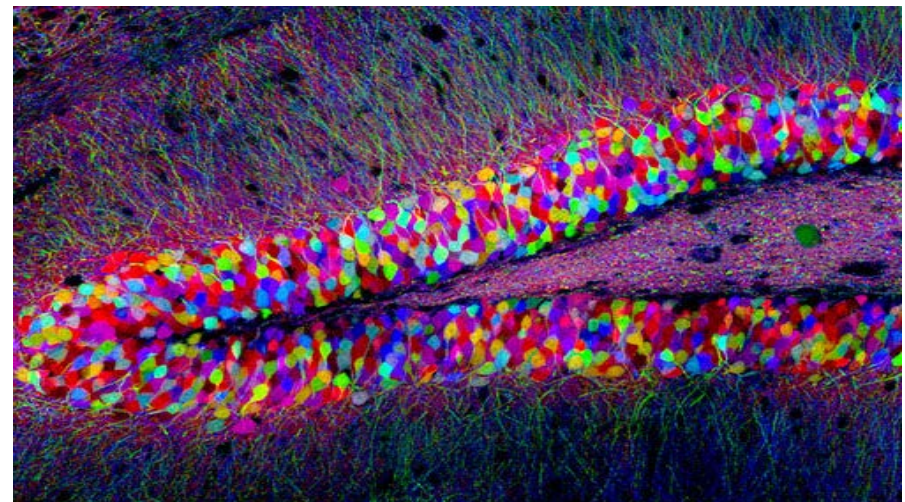
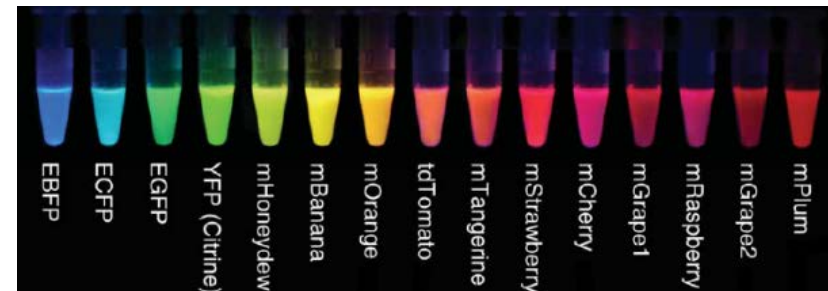
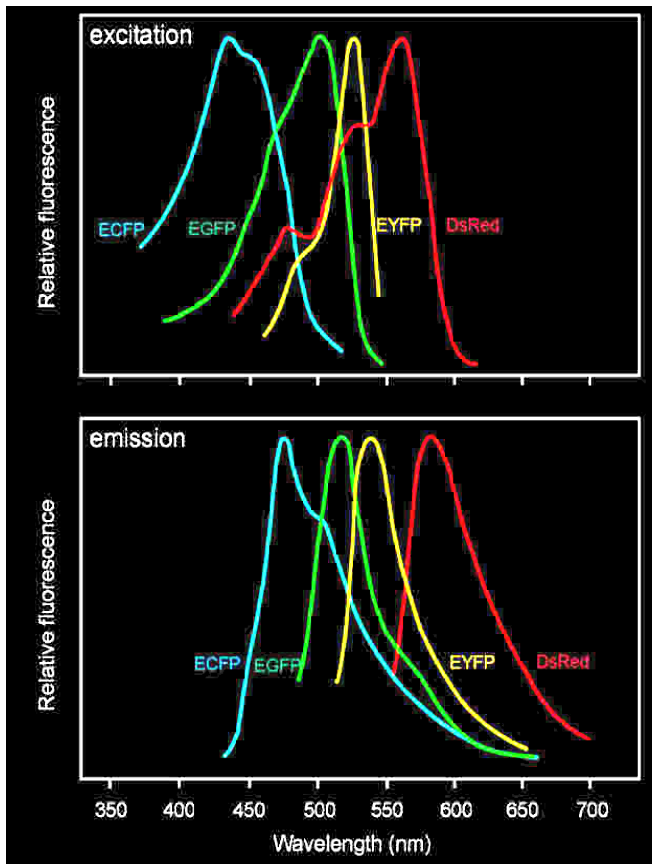
On peut ajouter d'autres avantages:

- spécificité du marquage
- compatible *in vivo* et non toxique
- simple d'utilisation
- peu chère
- versatile...



Protéines fluorescentes

Issues de gènes extraient de méduses ou de coraux, les protéines fluo combinent les avantages de la fluo et du génie génétique, d'où leur intérêt dans l'analyse des processus biologiques. Elles ont été optimisées pour différentes fonctions : spectrale, brillance, stabilité, vitesse d'expression, suivi de l'activité enzymatique, sensibilité au pH, au Ca^{2+} , au Cl^- ...



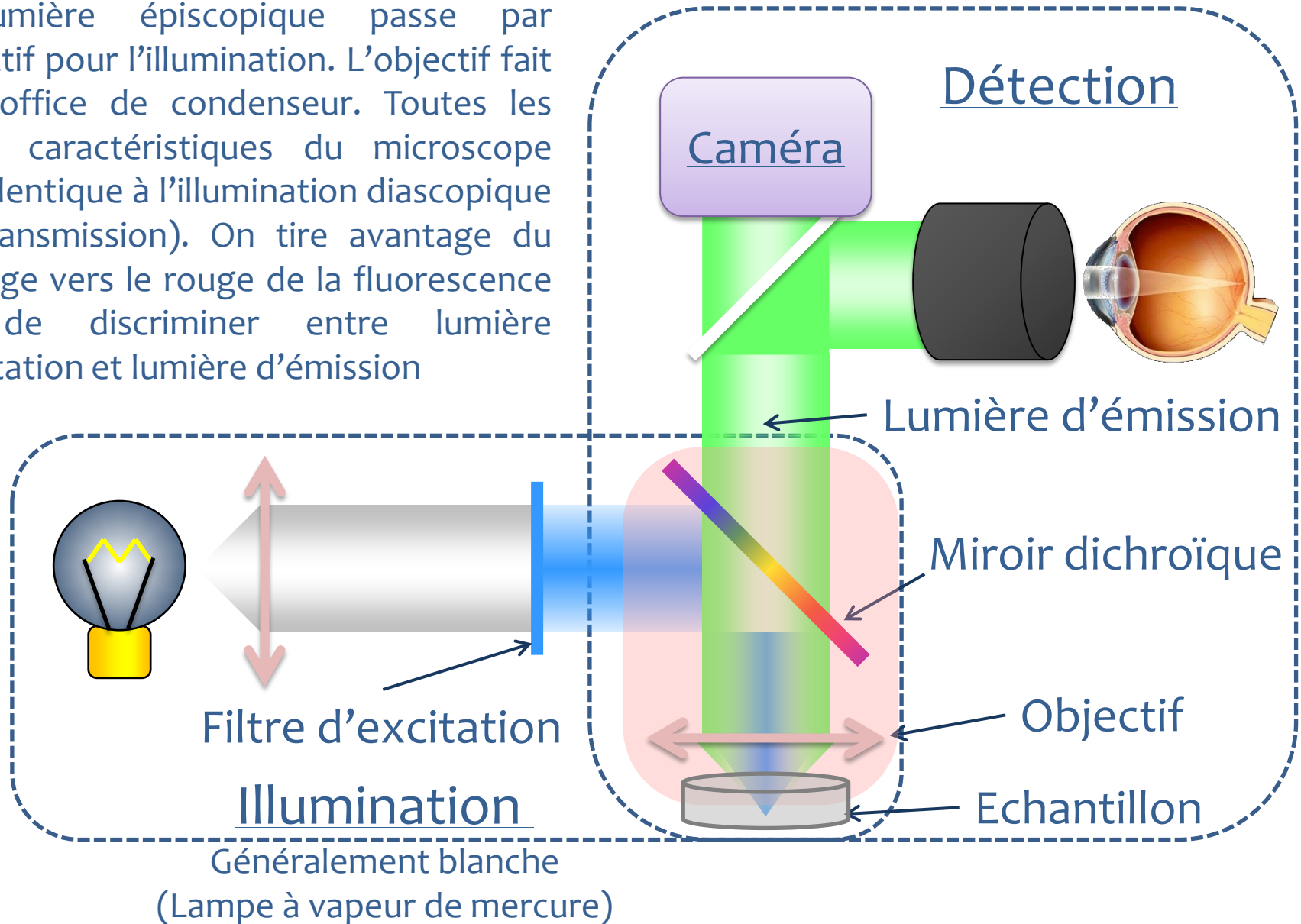
	Excitation Max. (nm)	Emission Max (nm)
CFP	434	477
GFP	489	508
YFP	514	527
Ds Red	558	583

Ce qui vous attend (encore)

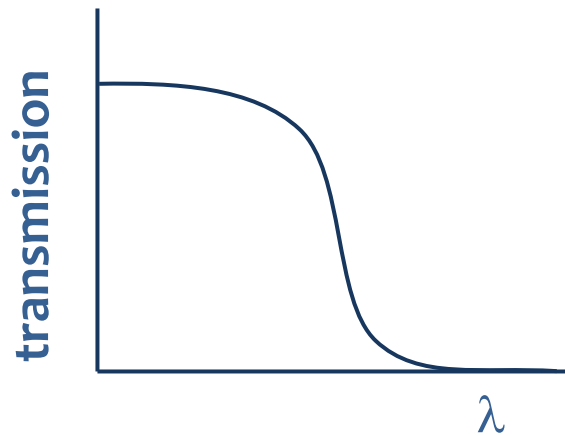
- ✓ Fluorescence ??
- Microscopie à épi-fluorescence
- Entrons dans la 3^{ème} dimension
- Imagerie multiphoton

Microscope à épi-fluorescence

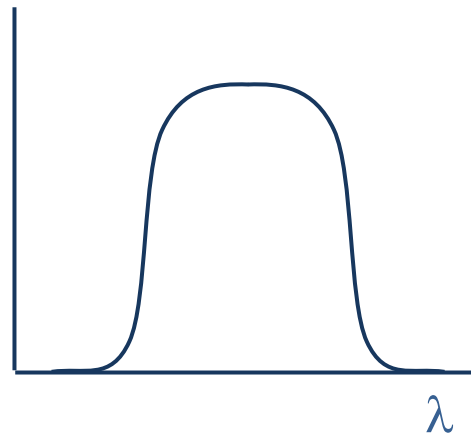
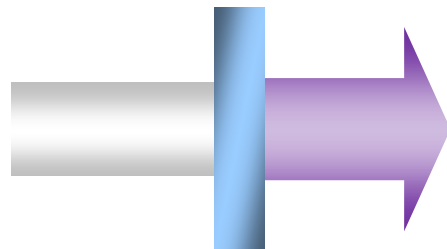
La lumière épiscopique passe par l'objectif pour l'illumination. L'objectif fait donc office de condenseur. Toutes les autres caractéristiques du microscope sont identiques à l'illumination diascopique (en transmission). On tire avantage du décalage vers le rouge de la fluorescence afin de discriminer entre lumière d'excitation et lumière d'émission



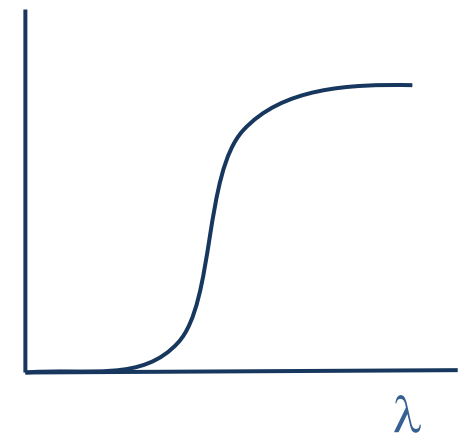
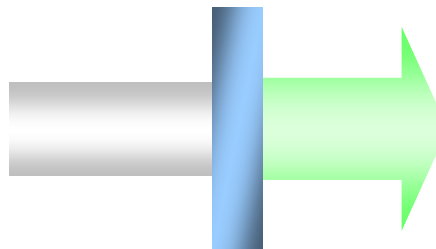
Différents types de filtres



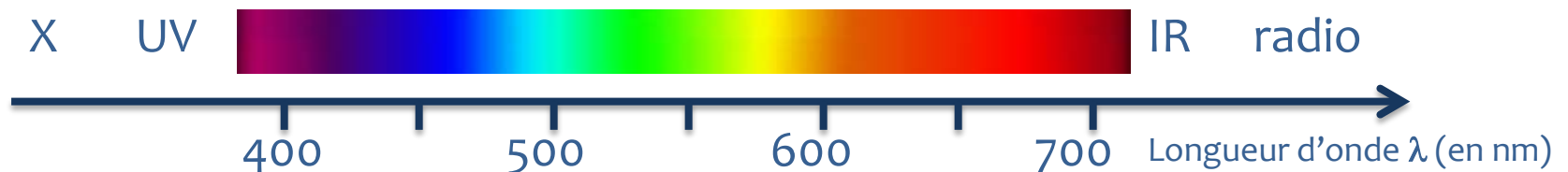
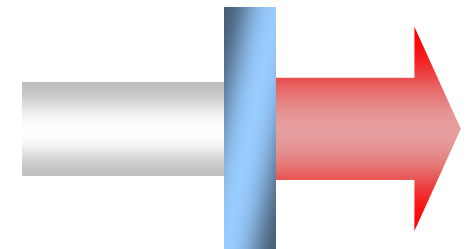
**passe-bas
(p-bas)**



**passe-bande
(PB)**

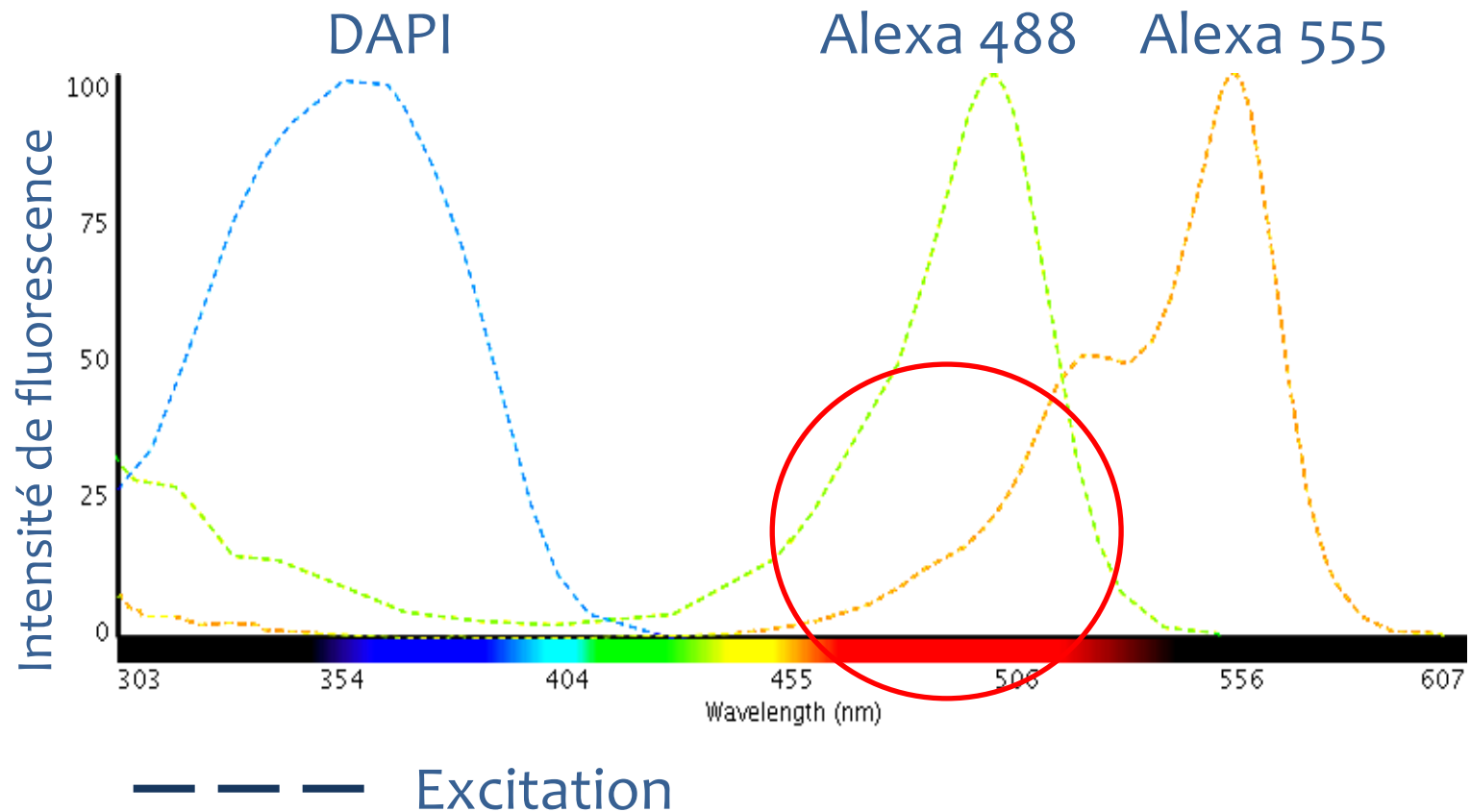


**passe-haut
(P-haut)**

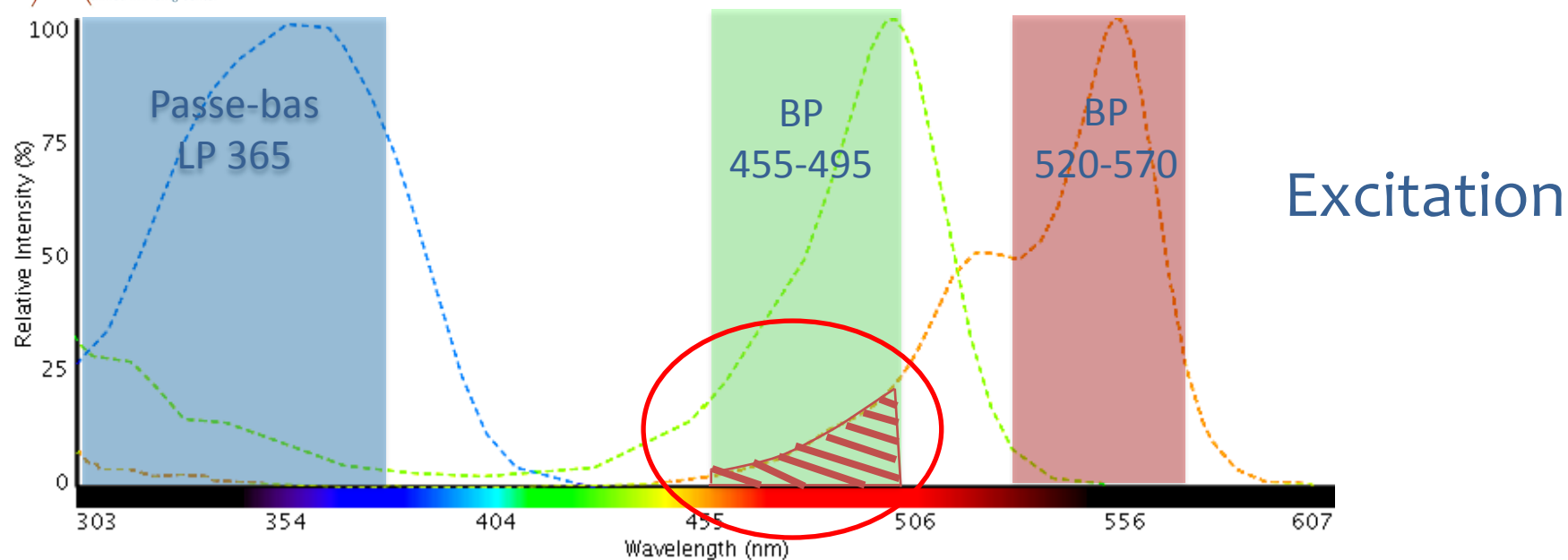


Différents types de filtres

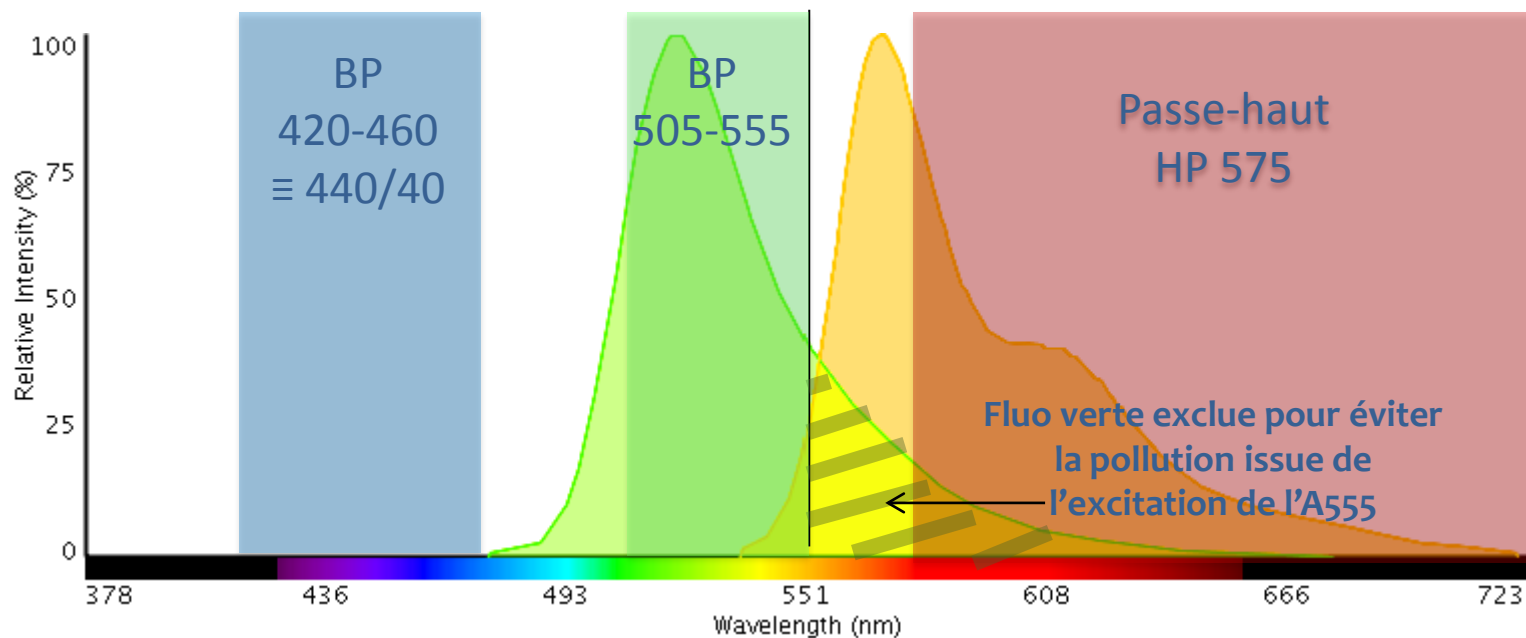
Les marquages multiples impliquent des choix avisés dans les filtres et les fluorophores utilisés, à cause du recouvrement des spectres d'excitation et d'émission. Dans l'exemple suivant, le spectre d'excitation de l'A555 montre un épaulement dans le spectre d'excitation de l'A488 : il faudra discriminer sur l'émission, quitte à exclure une partie du signal et faire les images de façon séquentielle.



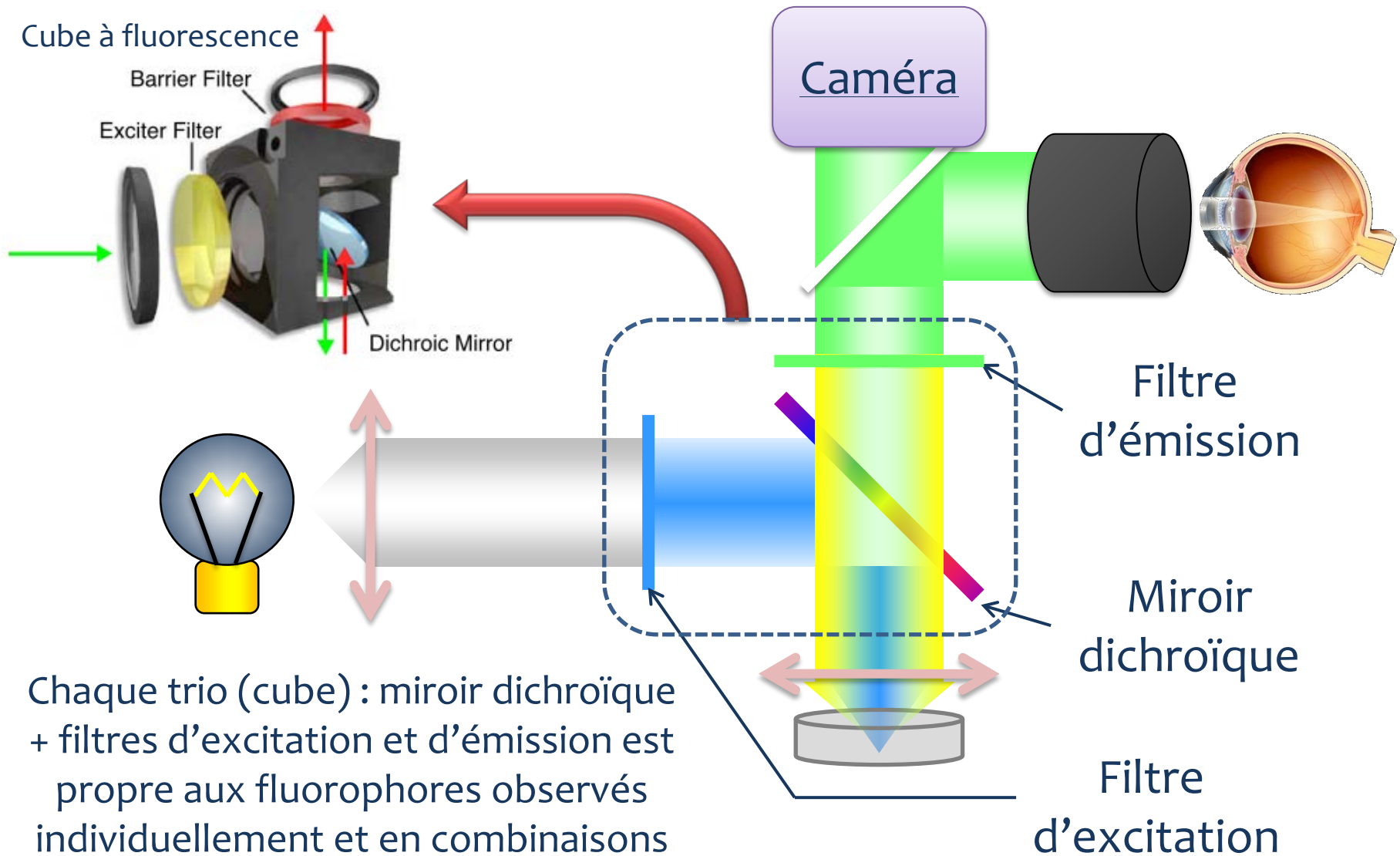
Différents types de filtres



Emission



Microscope à épi-fluorescence

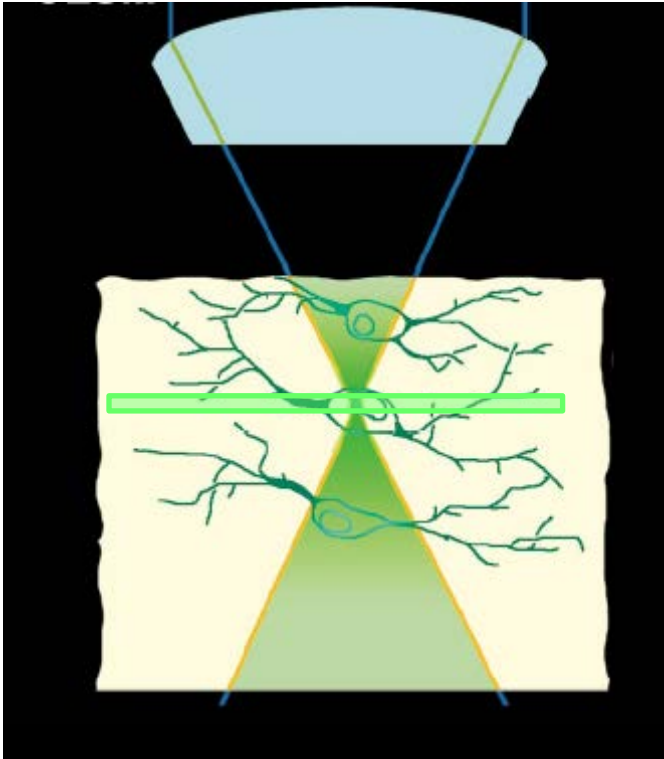


Chaque trio (cube) : miroir dichroïque + filtres d'excitation et d'émission est propre aux fluorophores observés individuellement et en combinaisons (marquages multiples)

Ce qui vous attend (encore)

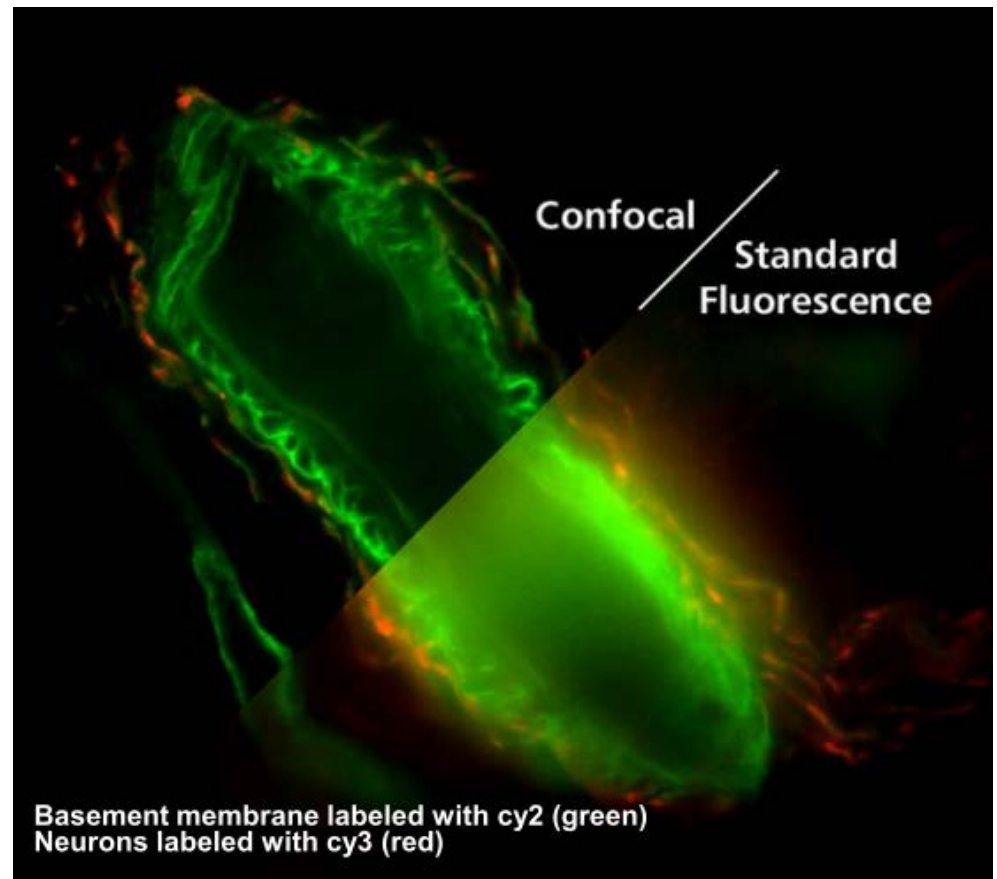
- ✓ Fluorescence ??
- ✓ Microscopie à épi-fluorescence
- Entrons dans la 3^{ème} dimension
- Imagerie multiphoton

Bienvenue dans la 3^{ème} dimension

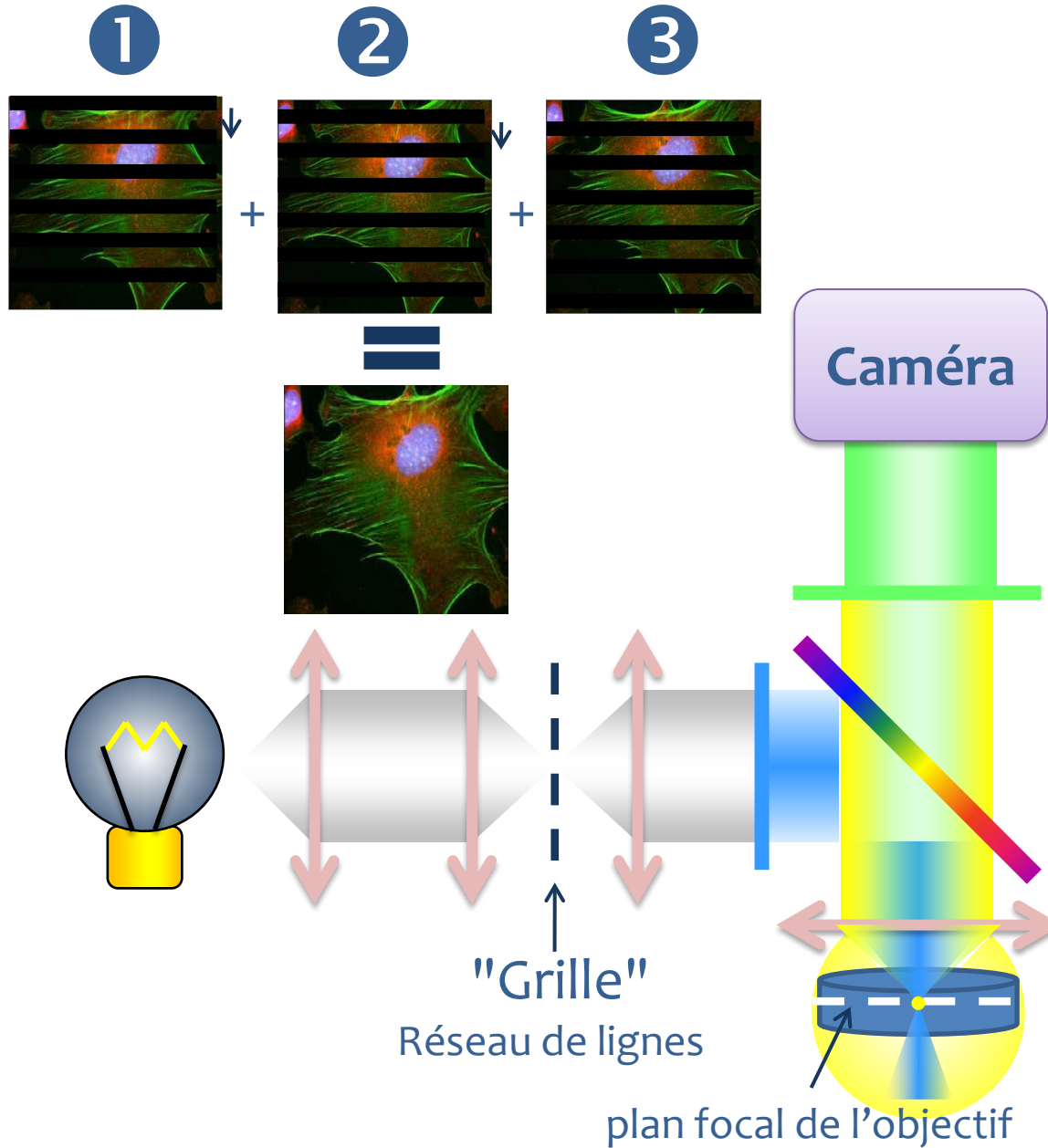


Il existe plusieurs techniques pour améliorer l'image, la principale est la microscopie confocale.

La fluorescence générée hors focus induit un effet de flou qui altère l'image.
On collecte tous les photons issus de la colonne d'illumination (diabolo).

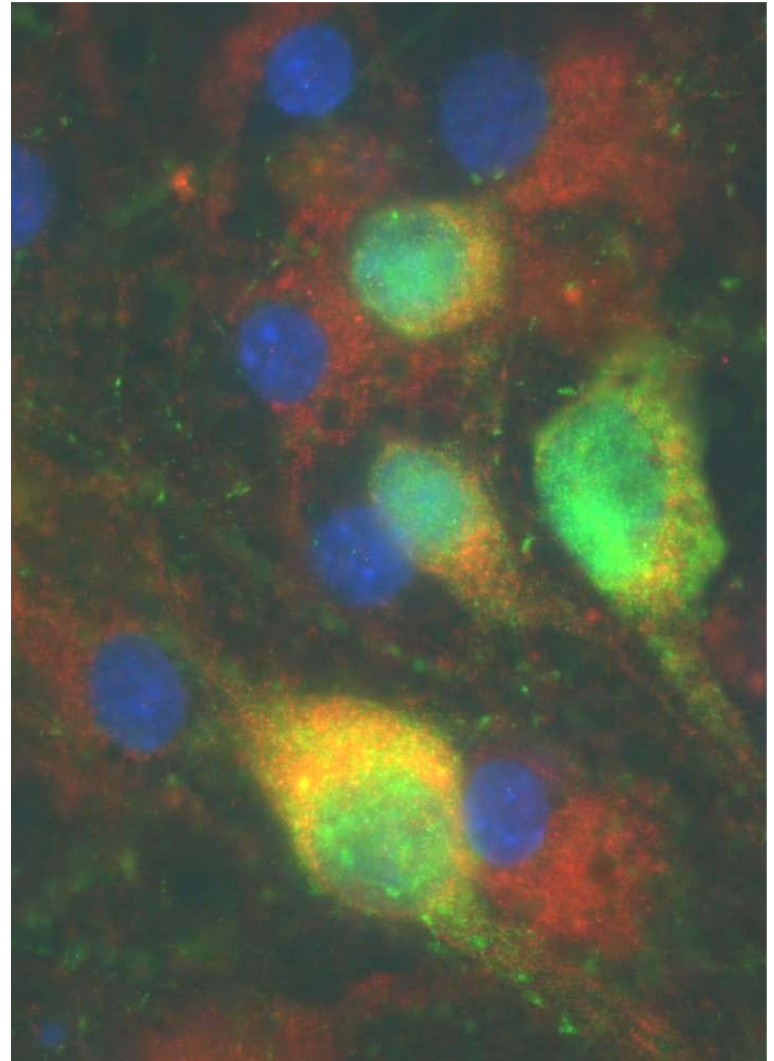
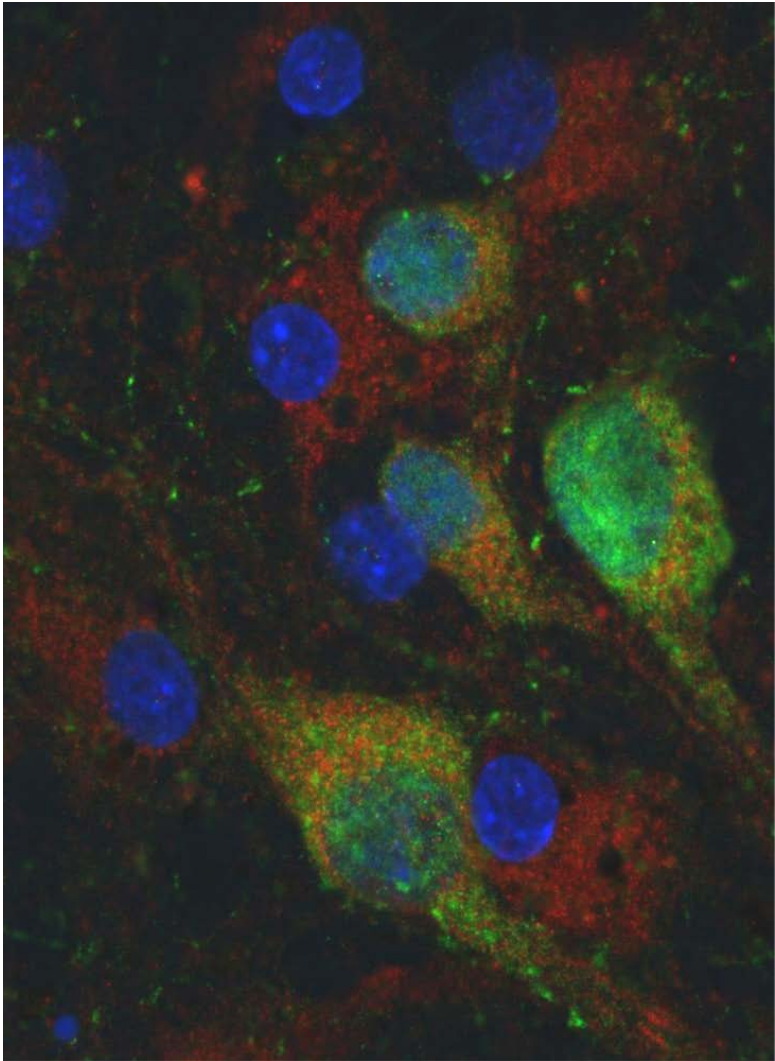


Microscope à Illumination structurée

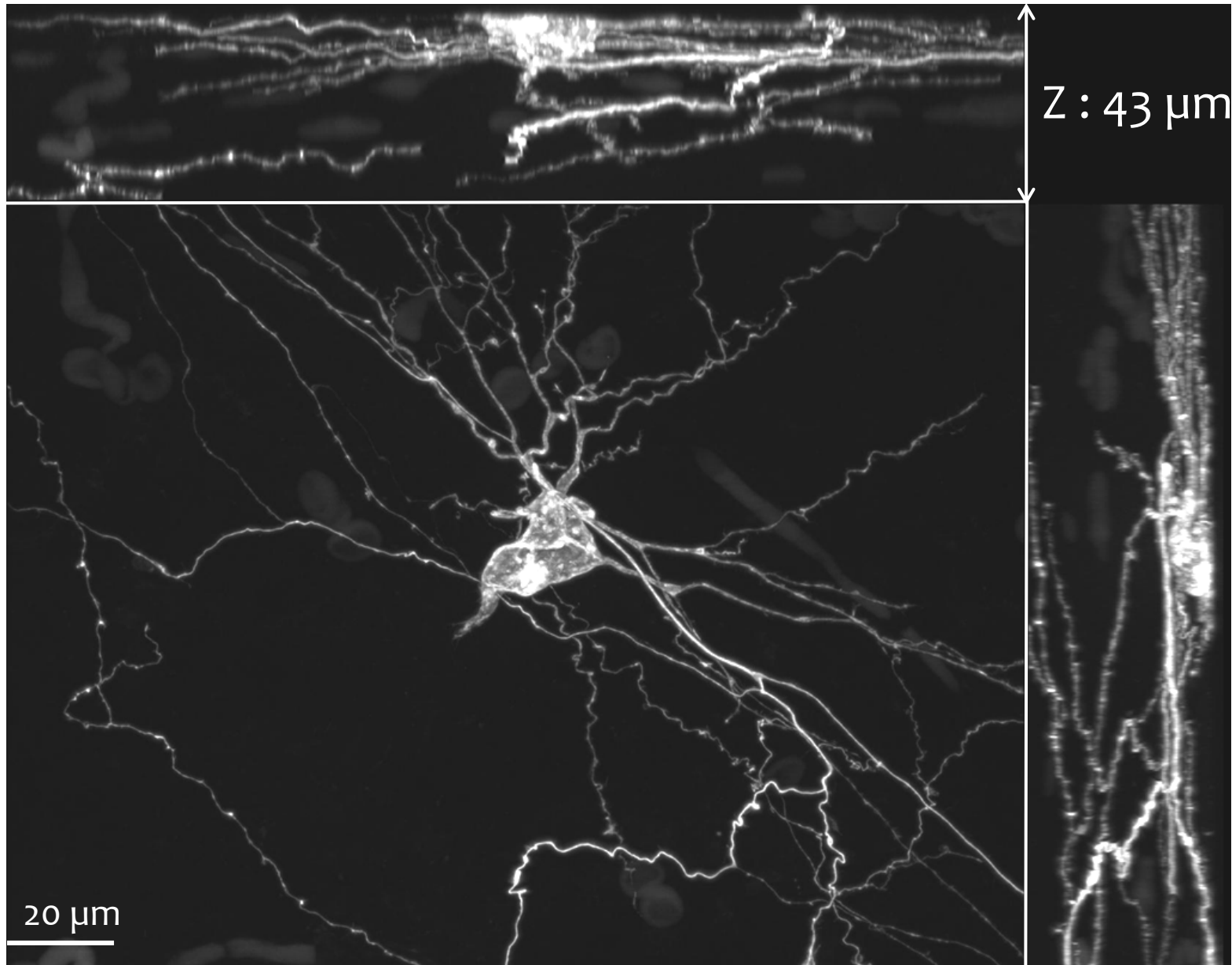


Un réseau de lignes opaques (grille) couvrant $1/3$ du champ est placé dans un plan focal conjugué au plan focal de l'objectif. On a une image nette de la grille au plan focal objet et $1/3$ du champ n'est donc pas excité. Les photons hors foyer et/ou diffusés qui arrivent à la caméra sont soustraits grâce au logiciel. En effet, l'ordinateur "sait" où sont les lignes opaques et les photons non pertinents sont éliminés. La grille est translatée d' $1/3$ de champs et une nouvelle image est générée puis filtrée. La fusion de 3 images zébrées successives dont les lignes sont décalées permet la reconstruction d'une image débruitée sur l'ensemble du champ (coupe optique).

Microscope à Illumination structurée



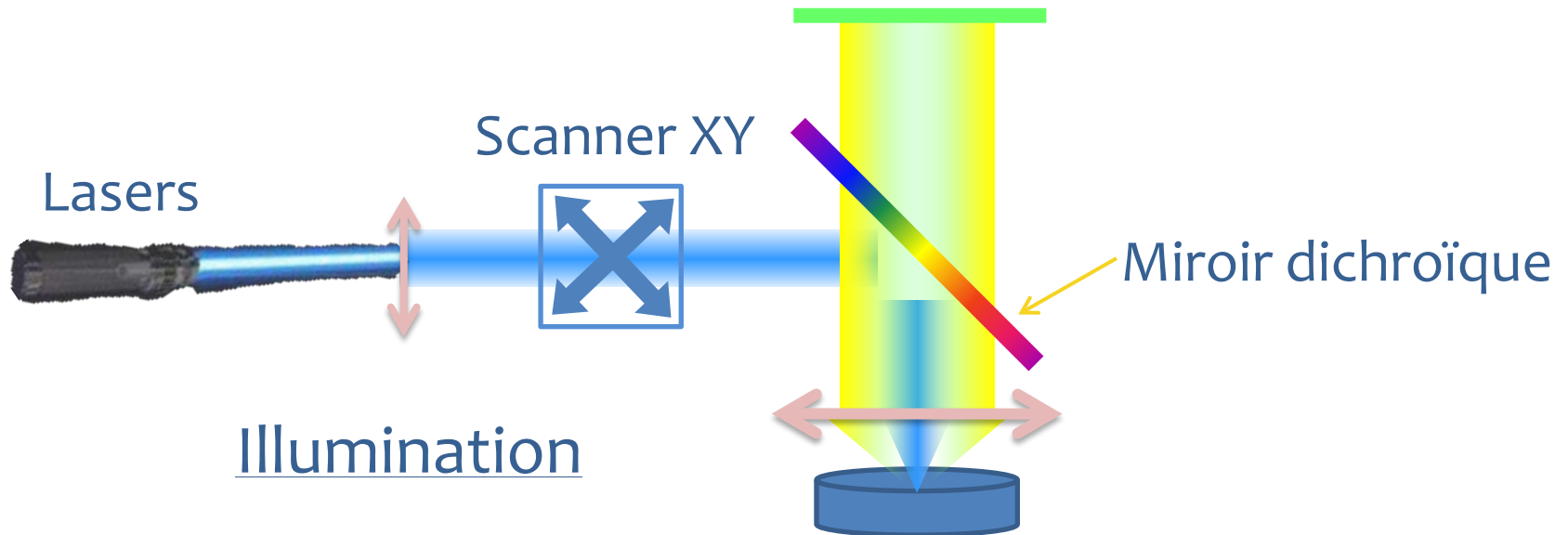
Microscope à Illumination structurée



40 X (1.3) cube TR tps d'expo : 15 ms (87 plans $\Delta Z=0.5 \mu\text{m}$)

Microscopie confocale

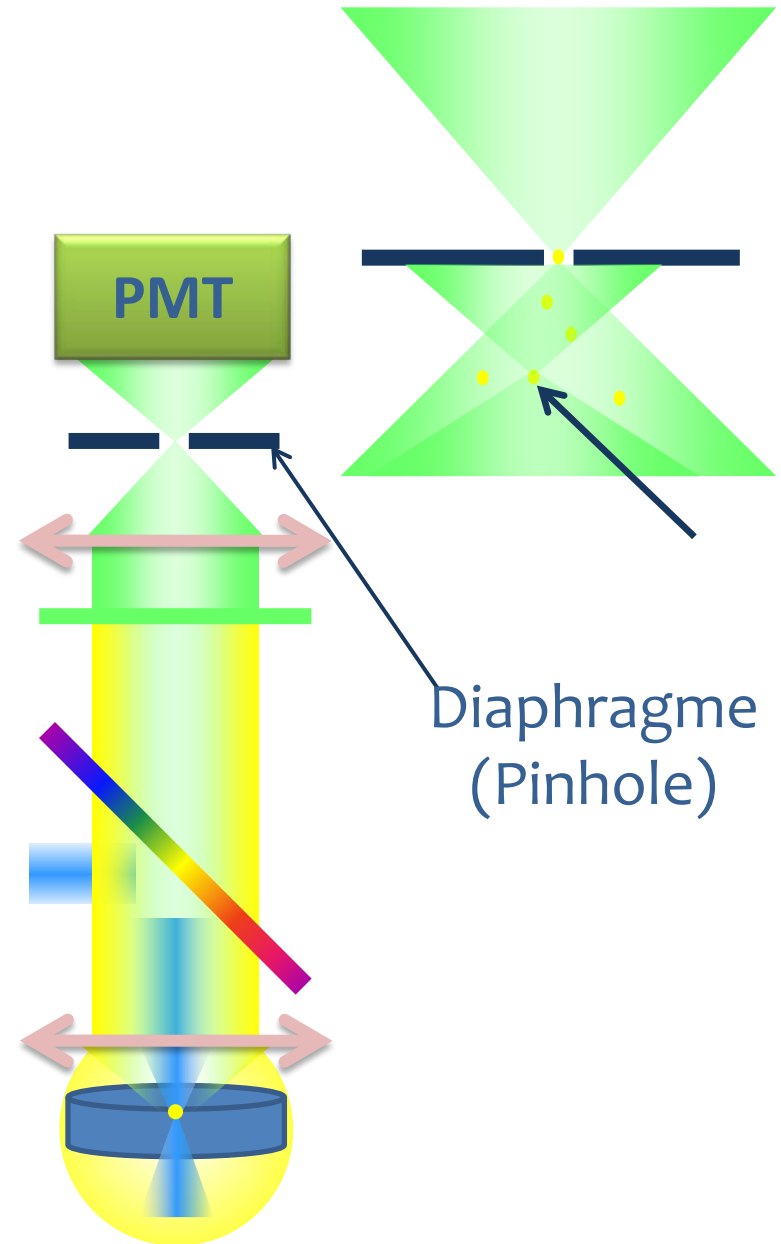
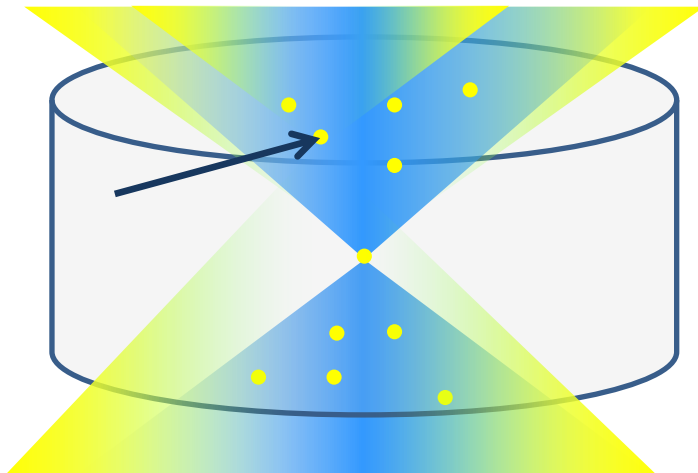
Dans un microscope confocal, l'illumination est gérée par des lasers. Un laser est une source de photons monospectrale (filtres d'excitation inutile). Ils passent dans un couple de miroirs motorisés (scanner XY) et illuminent l'échantillon par balayage. La fluorescence générée est captée par l'objectif puis filtrée (dichroïque et filtres d'émission) et envoyé vers un détecteur. Ce dispositif permet un gain au niveau de la qualité de l'image par une meilleur résolution XY grâce au pointé du laser et l'énergie délivrée localement est plus importante et mieux contrôlable qu'avec une lampe. La vitesse de balayage (temps de résidence sur le fluorophore) joue aussi sur la qualité de l'image.



Microscopie confocale

Détection

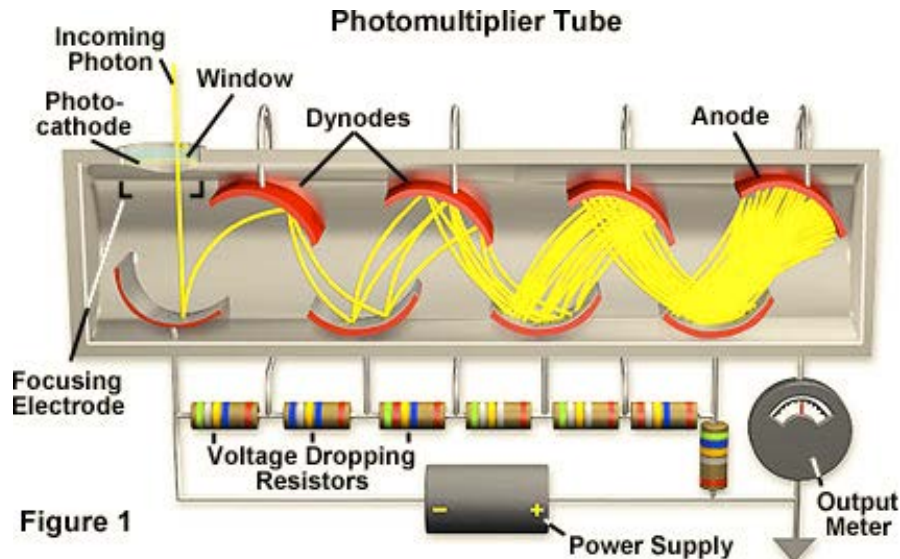
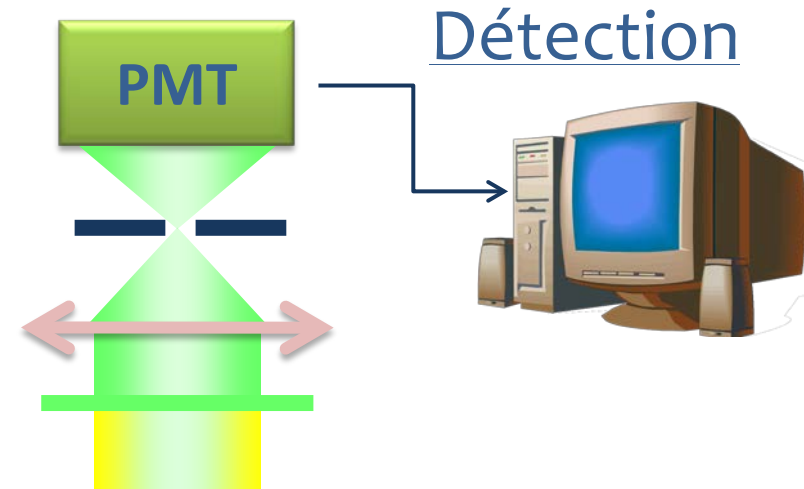
L'amélioration de la résolution en Z est obtenue en créant un point de focalisation de la lumière de fluorescence conjugué avec le point focal de l'objectif, avant le détecteur. Tous les photons qui ne sont pas issues du point focal de l'objectif sont bloqué par un diaphragme réglable (filtre spatial). On enlève donc les photons hors focus et on obtient une coupe optique de l'échantillon.



Microscopie confocale

la détection est effectuée par un tube photomultiplicateur (PMT). Il mesure la quantité de photons (quelque soit λ) en fonction du temps (échantillonnage temporel) et la taille du pixel correspond donc au temps δt d'intégration du signal.

Au temps t_1 le point de scan de coordonnée (x_1y_1) la fluo a une intensité F_1 , au temps t_2 (x_2y_2) la fluo est F_2 ... L'image est représentée pixel par pixel avec les valeurs F_n (X_nY_n) .



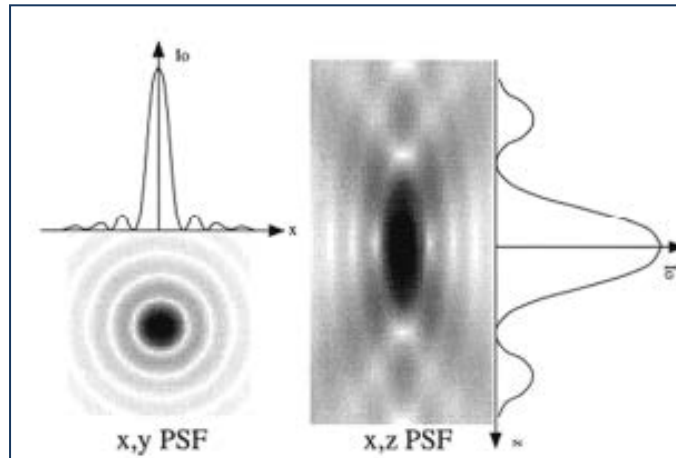
Un PMT est un détecteur qui transforme les photons en électrons et qui amplifie le courant généré par une forte différence de potentiel entre la photocathode d'entrée et l'anode de sortie (+ de 1000 V). L'amplification est due à l'utilisation d'électrodes intermédiaires (dynodes) portées à des potentiels positifs croissants qui émettent une gerbe d'électrons à l'arrivée de chaque photo-électron incident.

Microscopie Confocale (résolution)

Microscope à fluorescence

$$\text{Res}_{xy} = 0.61\lambda / \text{ON}$$

$$\text{Res}_z = 2\lambda / \text{ON}^2$$

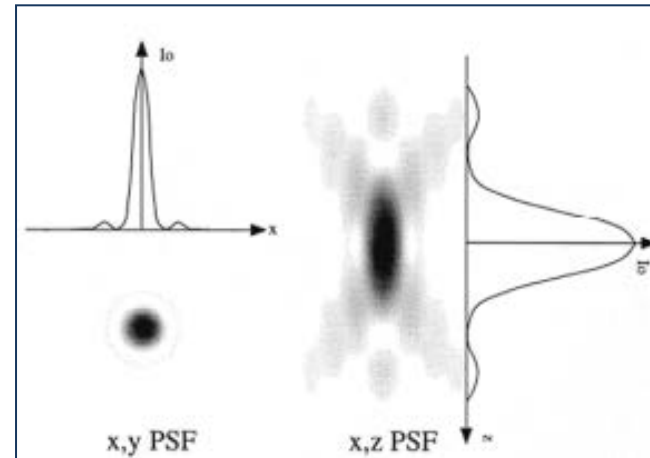


Résolution max en $xy \approx 220 \text{ nm}$
 Résolution max en $z \approx 600 \text{ nm}$

Microscope confocal

$$\text{Res}_{xy} = 0.4\lambda / \text{ON}$$

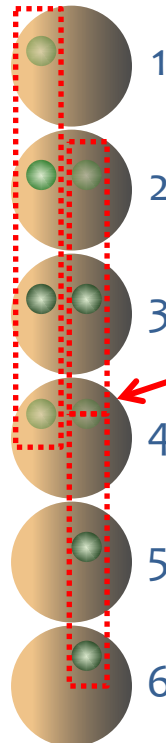
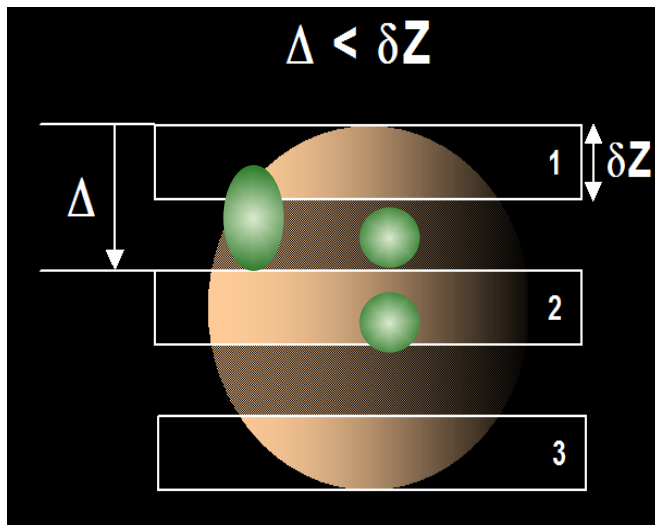
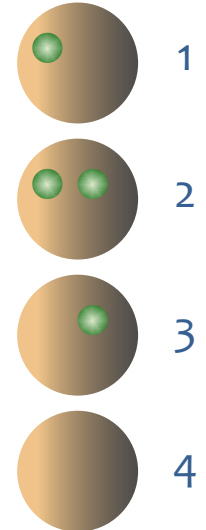
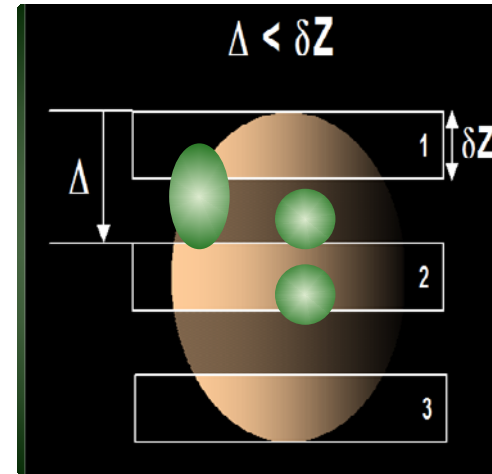
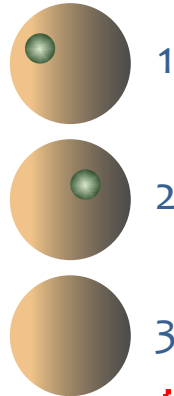
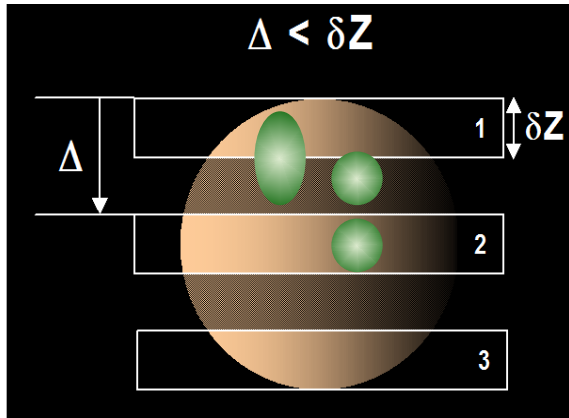
$$\text{Res}_z = 1.4\lambda / \text{ON}^2$$



Résolution max en $xy \approx 130 \text{ nm}$
 Résolution max en $z \approx 350 \text{ nm}$

Plus l'ON est grande, meilleure est la résolution

Microscopie Confocale (échantillonnage axial)



Il ne faut pas confondre résolution et épaisseur de coupe optique
 $\delta Z = f(\text{ON}, n, \lambda, \text{pinhole} \dots)$

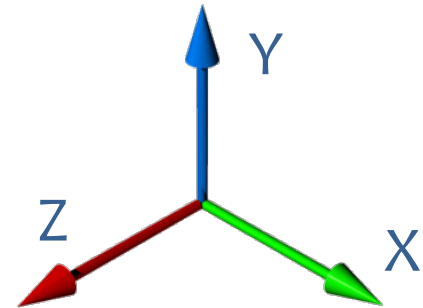
Le pas optimal de déplacement en Z (ΔZ) est fonction de la résolution ($\text{Res}_z = 1.4\lambda / \text{ON}^2$) et des lois de l'échantillonnage :
 $1/2 \text{ Res}_z < \Delta Z < 1/3 \text{ Res}_z$

Pixels et Voxels ...

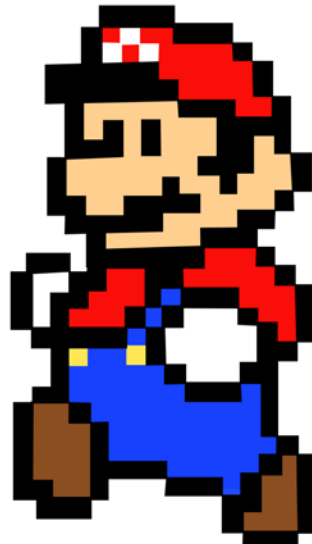
“Picture element” et “volumetric elements” ; échantillonnage



$Y \gg X=Z$



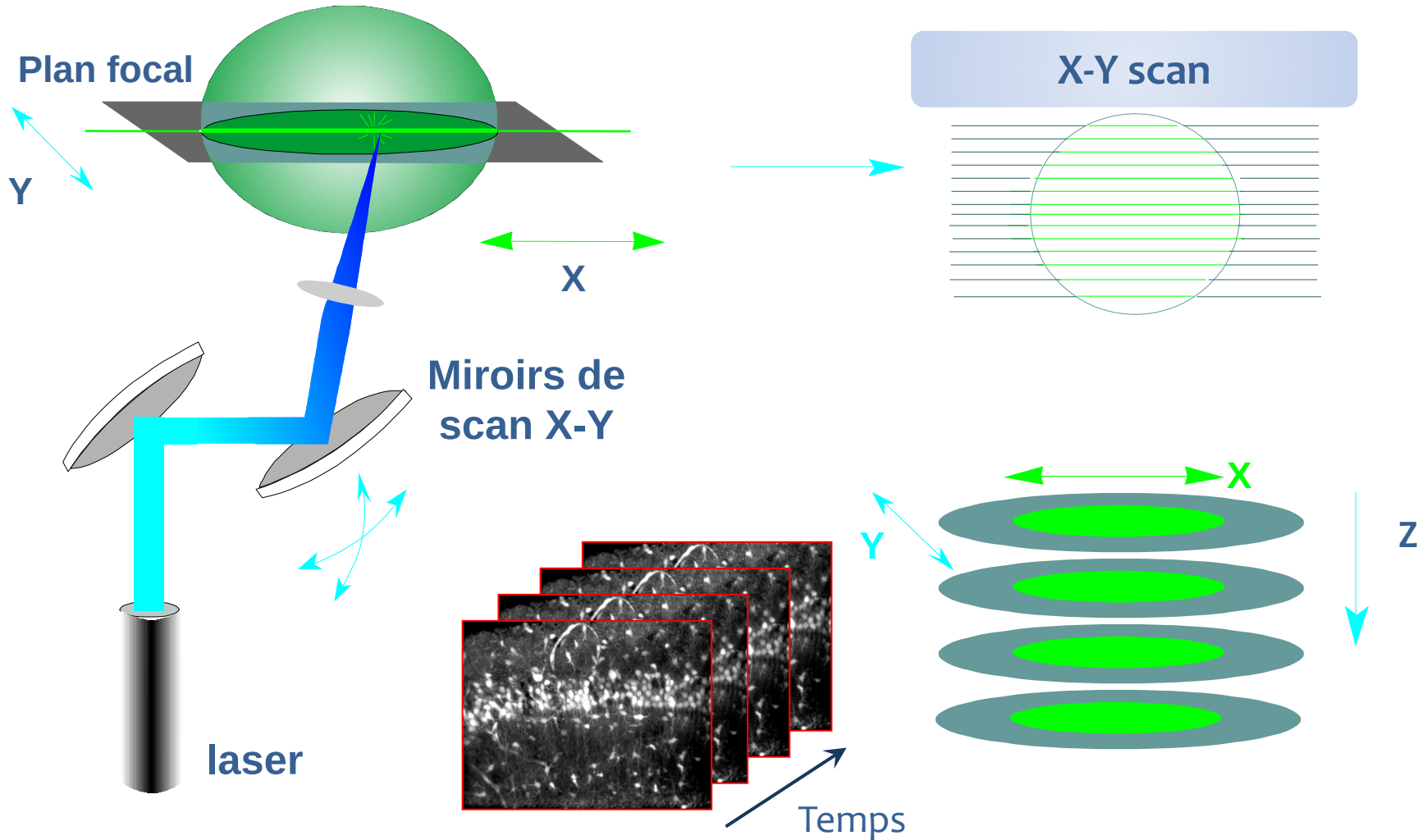
$X \gg Y=Z$



$Y=X \text{ et } Z=0$



Microscopie confocale multidimensionnelle



Les dimensions peuvent être : la profondeur Z , le temps T , la couleur λ ...
On peut donc faire des images 3, 4 voir 5D

Microscopie Confocale à spinning disk (nipkow)

- Pénétration limitée dans la profondeur du tissu épais (<40 - 100 μm suivant le tissu et le fluorophore)
- Photo-blanchiment dans et en dehors du plan focal plus faible qu'en balayage mono-faisceau
- Résolution temporelle adaptée pour les études *in vivo* (>50 Hz caméras EMCCD)

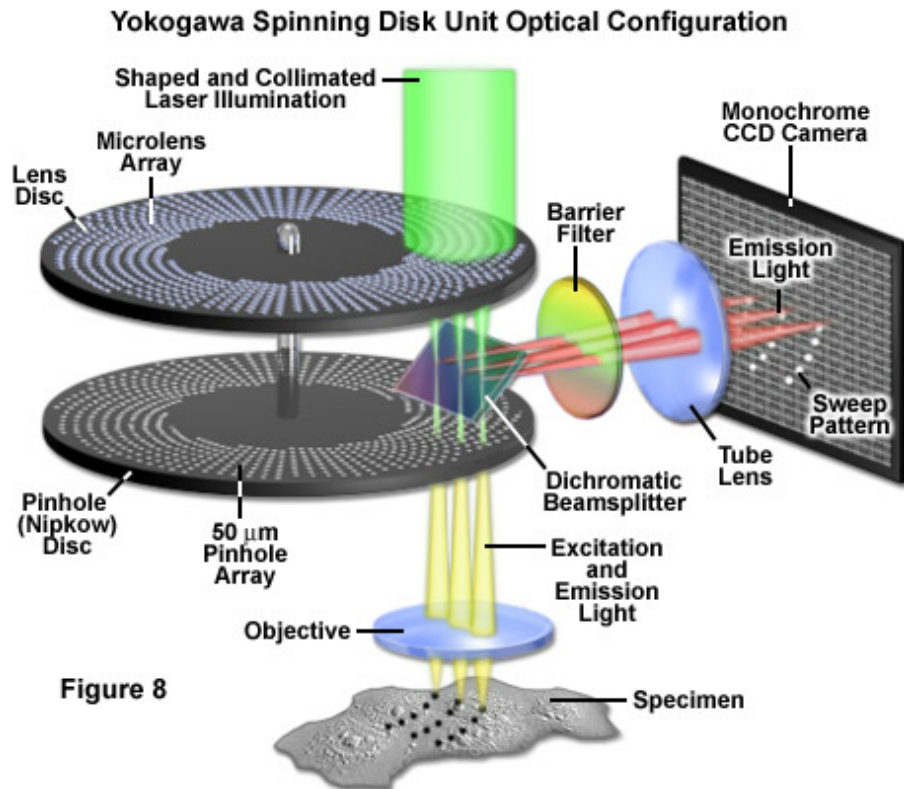
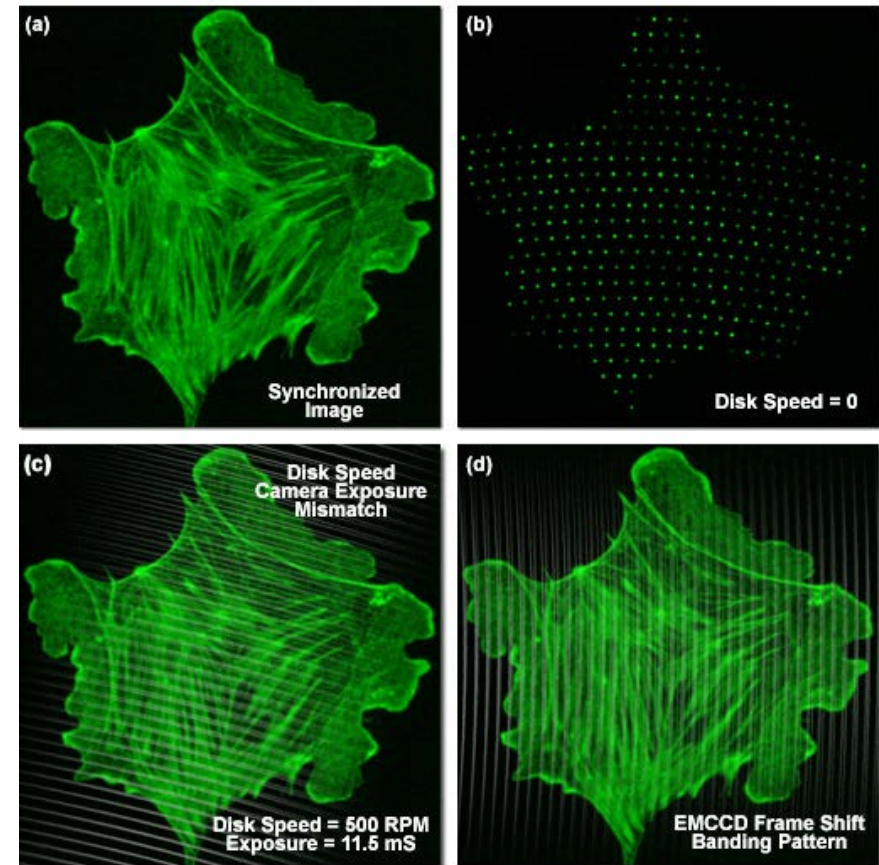


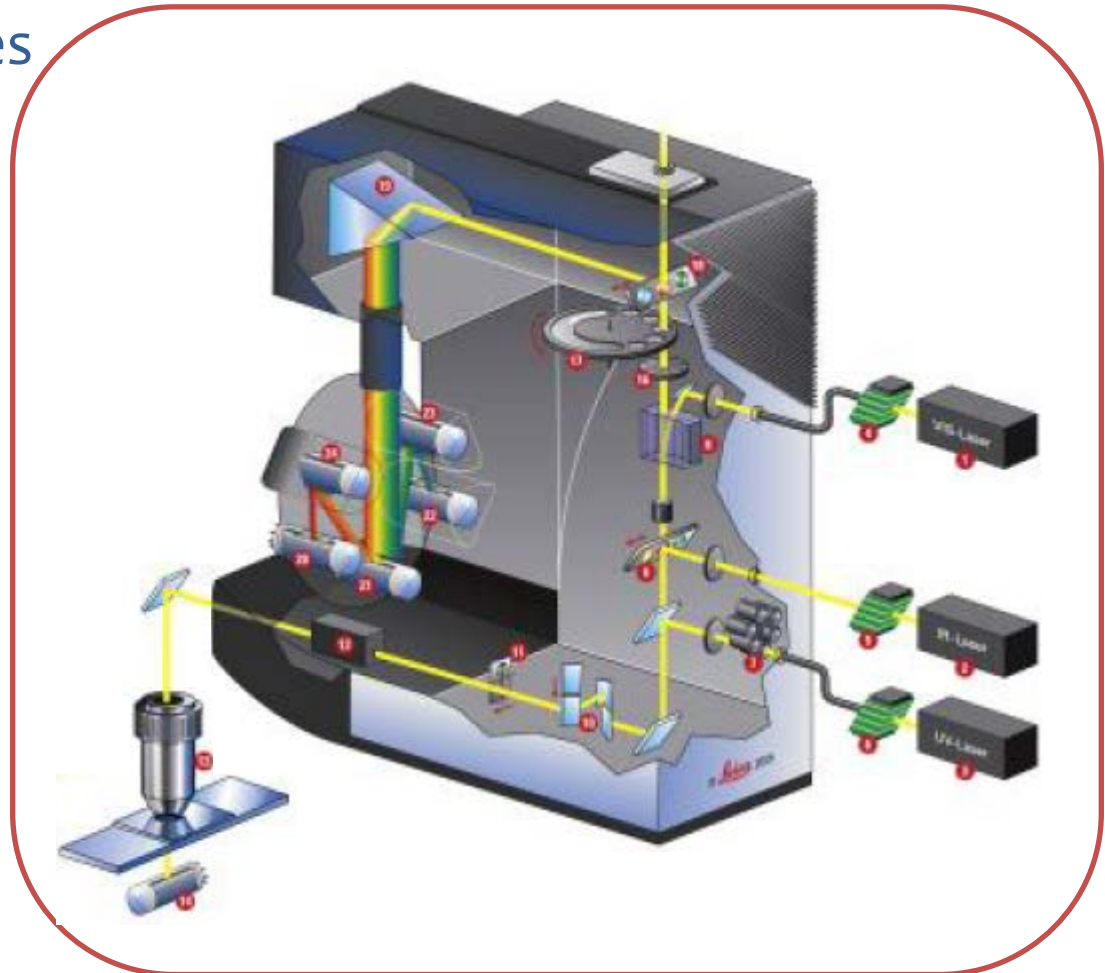
Figure 8

Unsynchronized Image Capture in Spinning Disk Microscopy



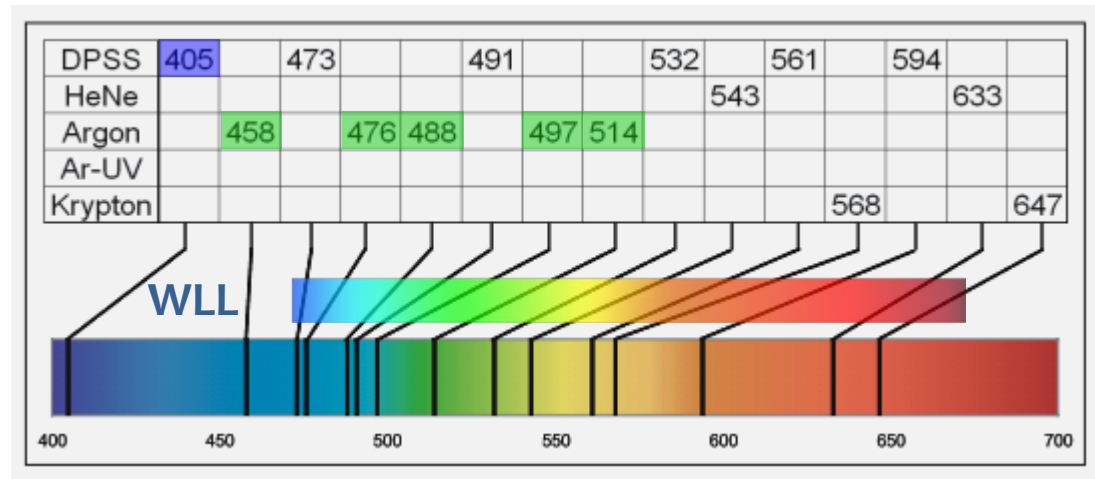
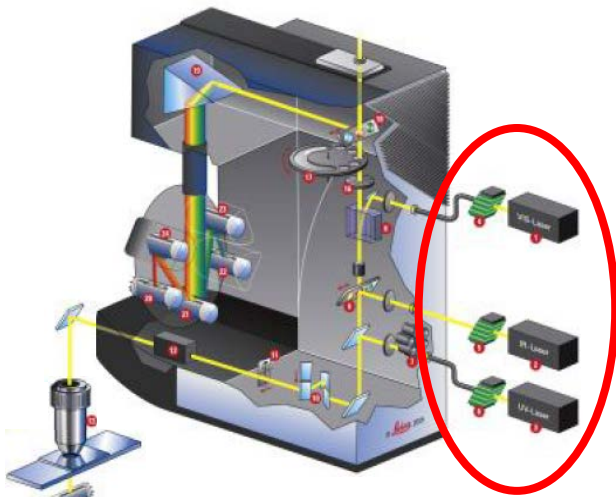
Confocal Leica SP5-X

- Laser blanc
- Lasers Argon et diode UV-bleu
- AOBS
- Prisme + fentes spectrales
- 1 PMT + 2 Hybrides
- Platine motorisée

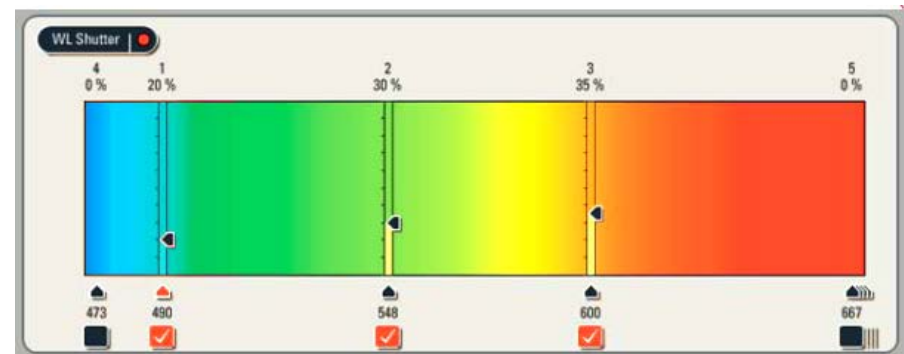


Confocal Leica SP5-X : Lasers

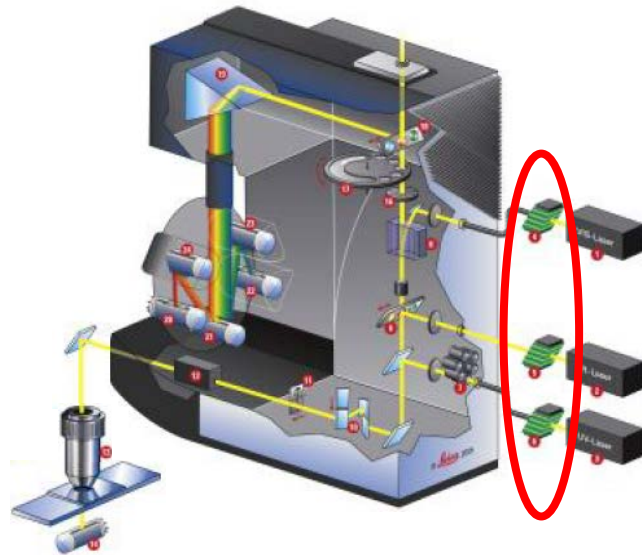
- Lasers Argon (458, 476, 488, 497, 514 nm)
- Diode UV-bleu (405 nm)
- Laser blanc (470-670 nm) : 8 raies possibles séparées de 8 nm, de 1.5 à 6 mW par raie



AOTF
(Acousto-Optic Tunable Filter)



Confocal Leica SP5-X : AOTF



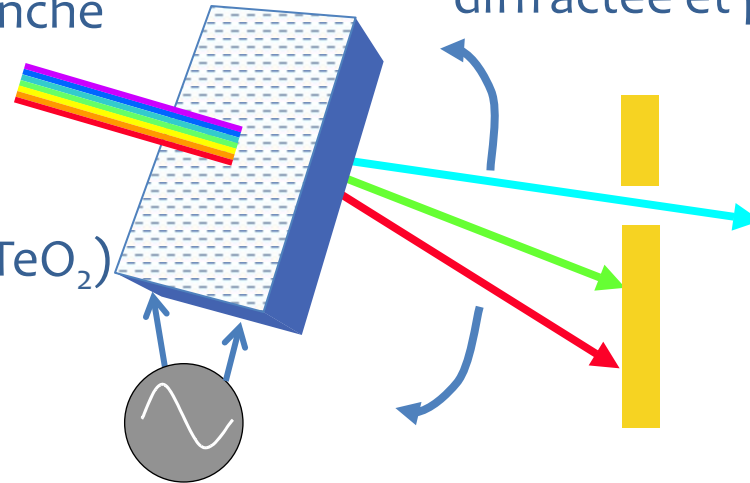
Cristal biréfringent (TeO_2)

FONCTIONNEMENT DE L'AOTF (Acousto-Optic Tunable Filter)

Lumière
blanche

Raie monochromatique
diffractée et polarisée

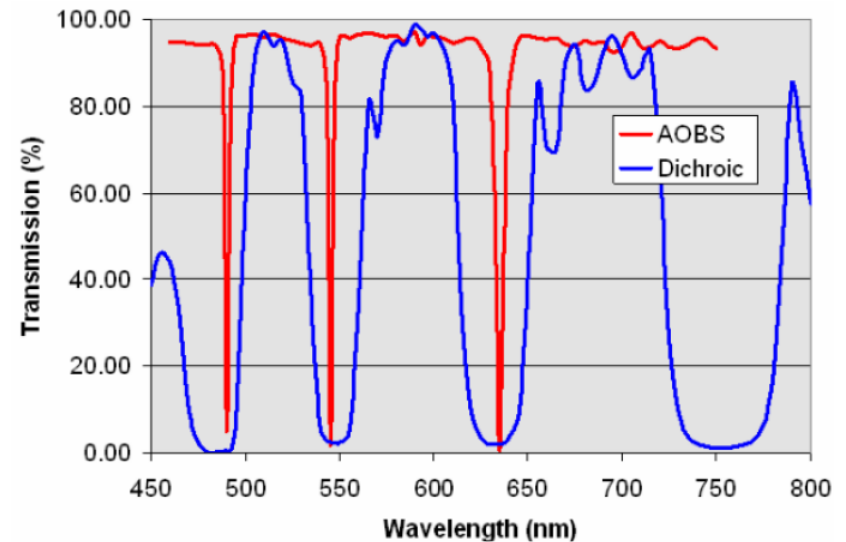
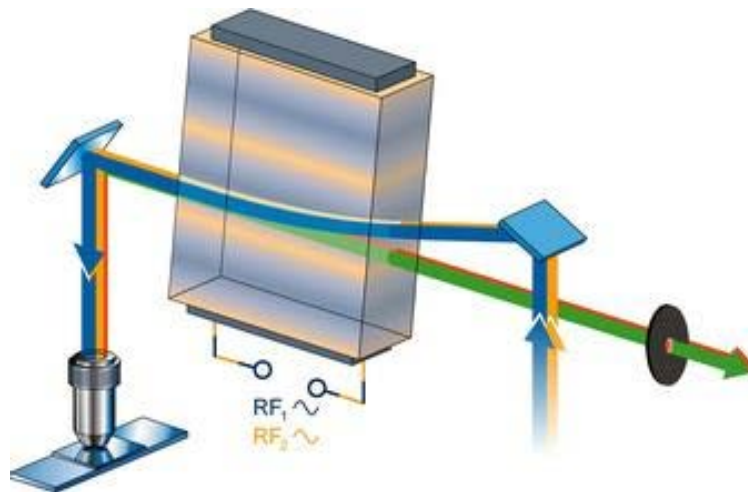
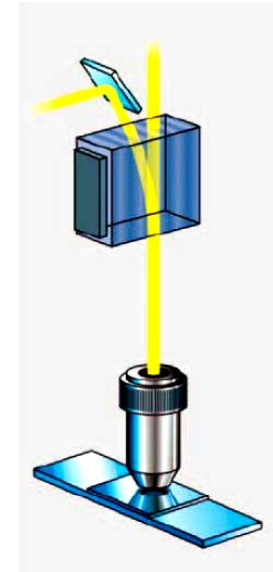
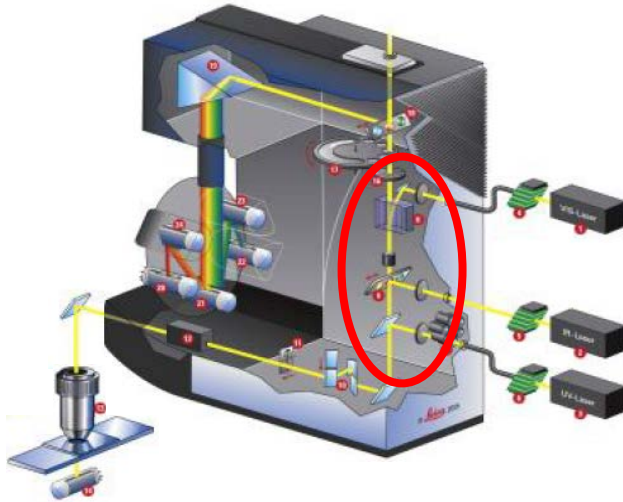
Radiofréquences



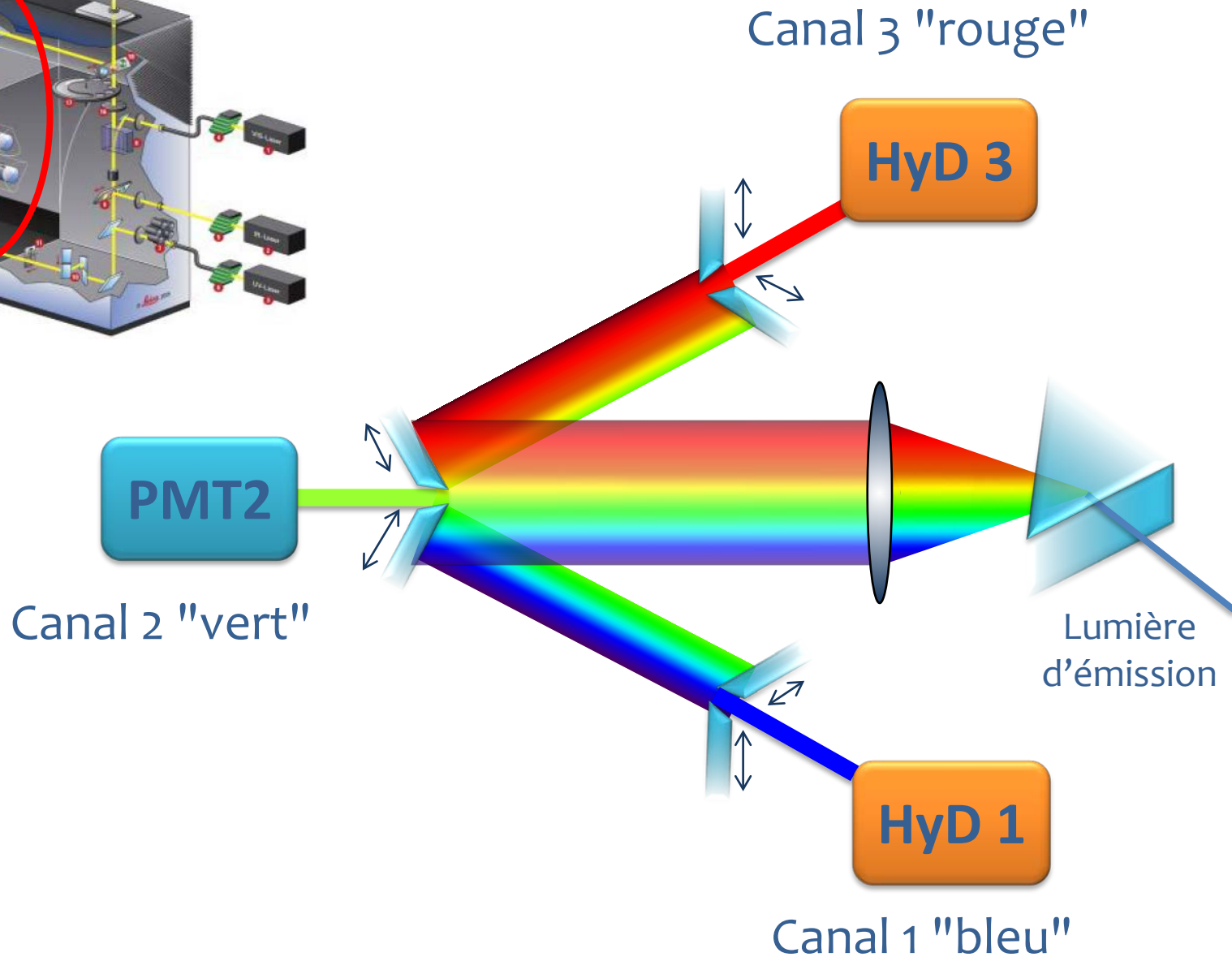
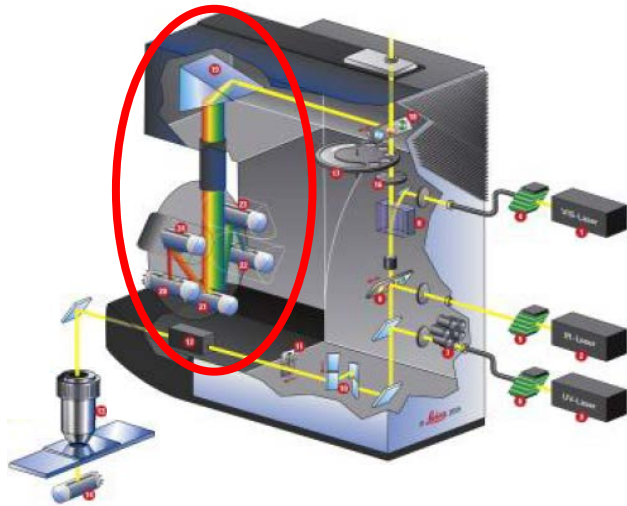
L'amplitude de l'onde radio perpendiculaire influe sur la transmission et sa fréquence sur la longueur d'onde du faisceau lumineux

Confocal Leica SP5-X : AOBS

Acousto-Optic Beam Splitter

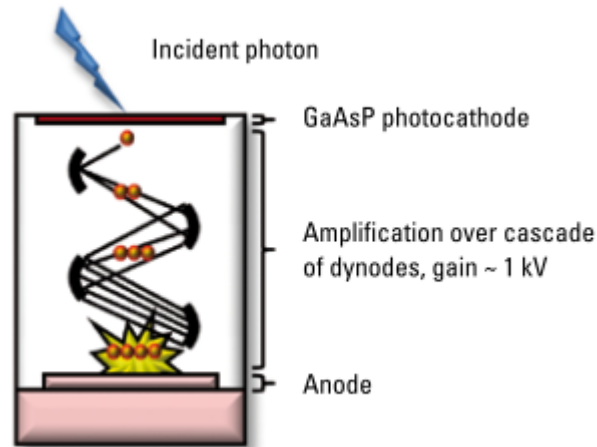


Confocal Leica SP5-X : détection spectrale

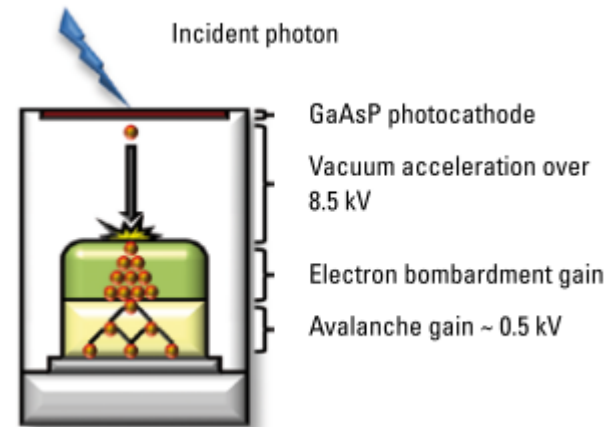


Confocal Leica SP5-X : Détecteurs Hybrides

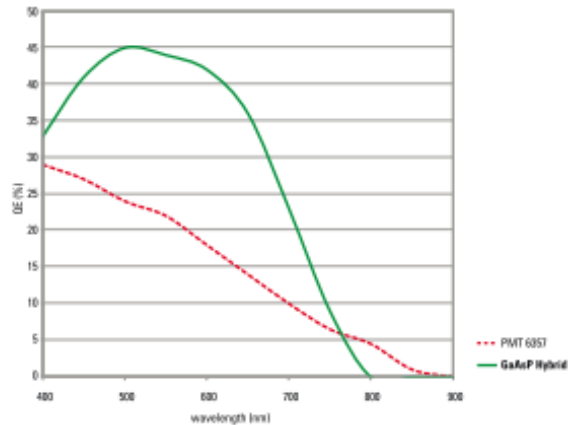
PMT GaAsP (Gallium-Arsenide-Phosphide)



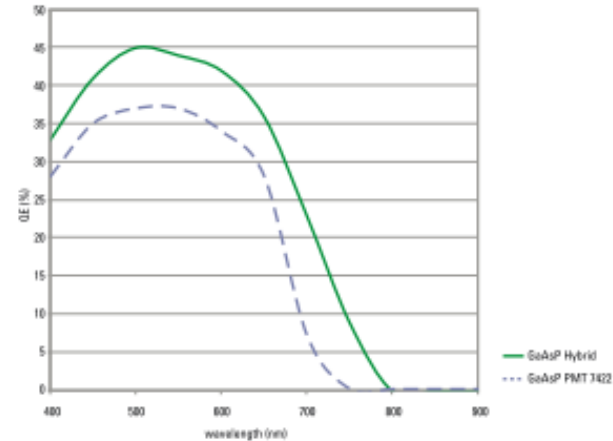
Détecteurs Hybrides : HyD



HyD's quantum efficiency is superior to standard PMTs ...

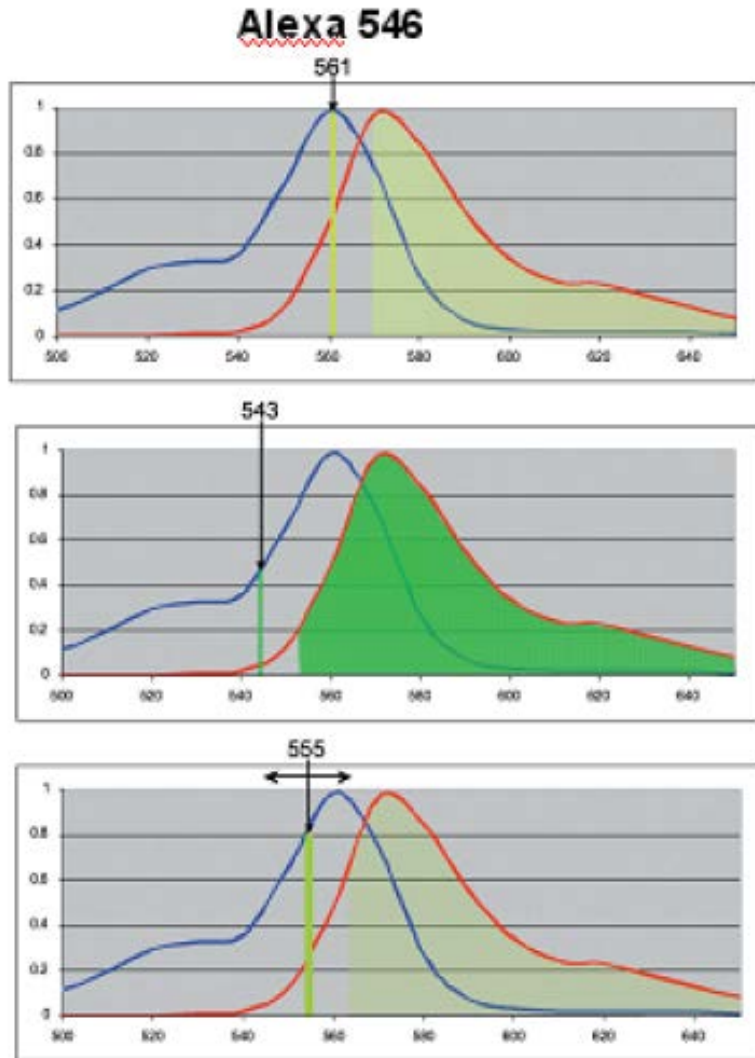


... and even to GaAsP PMTs

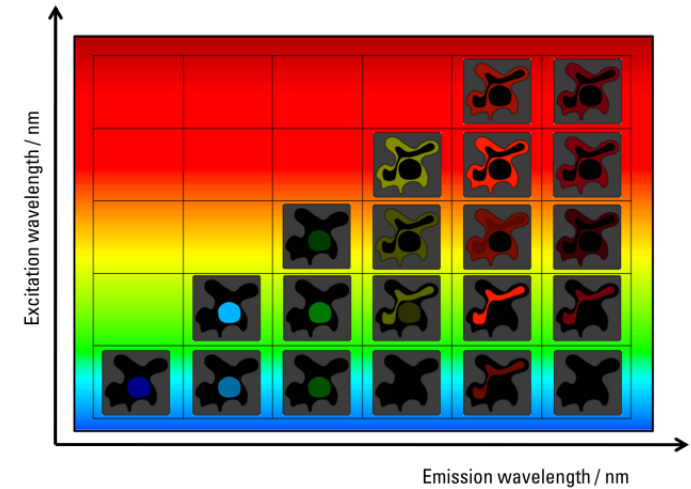


Confocal Leica SP5-X : excitation/détection spectrale

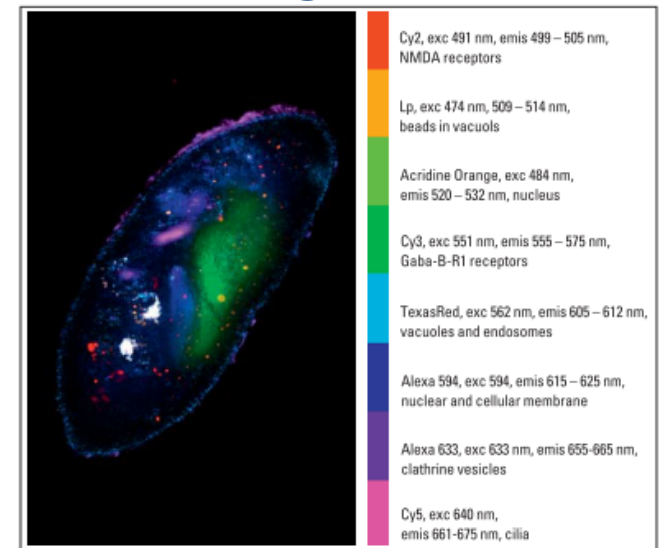
Optimisation de l'excitation



Carte λ^2



Marquage multiple



Limitations de la microscopie confocale

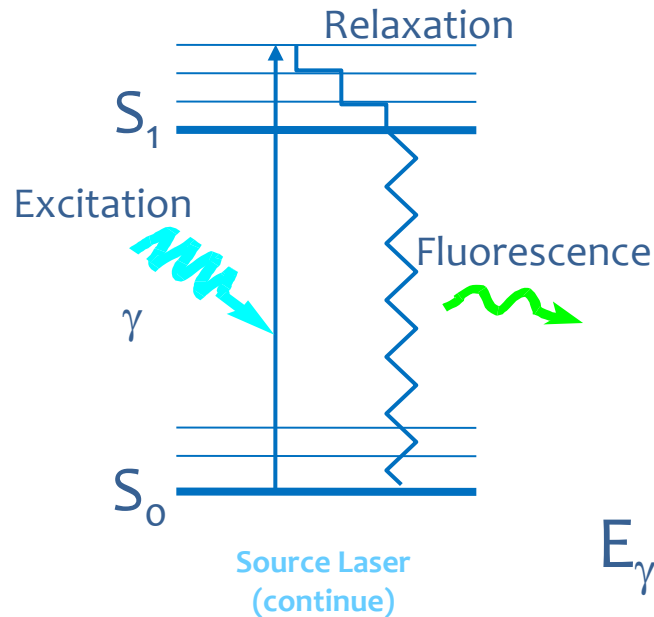
- Pénétration limitée dans la profondeur du tissu épais (<60 - 150 μm suivant le tissu et le fluorophore)
- Photo-blanchiment dans et en dehors du plan focal : limitation de la durée des expériences et du nombre d'image par champs.
- Photo-toxicité : Problèmes avec les tissus vivants due à l'énergie issue de l'excitation en lumière UV et au photo-blanchiment.
- Résolution temporelle inadaptée pour les études *in vivo*

Ce qui vous attend (encore)

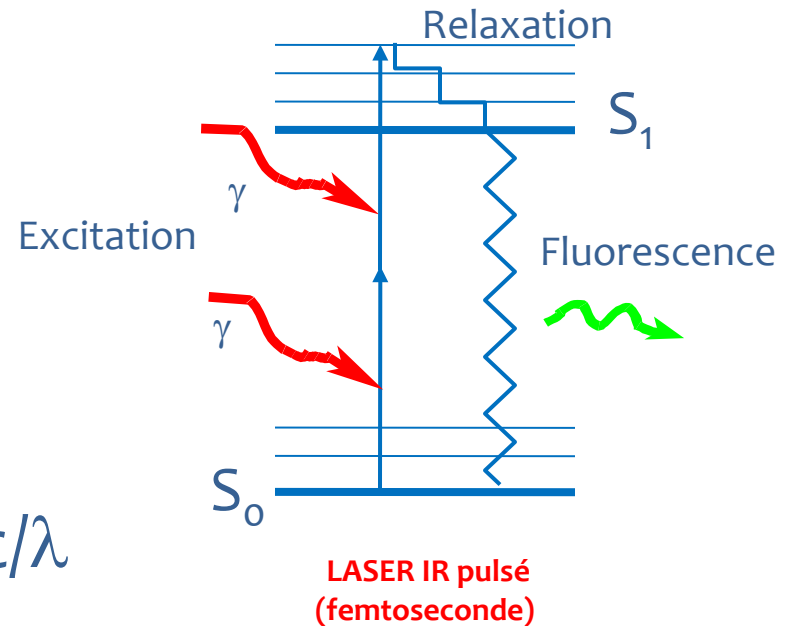
- ✓ Fluorescence ??
- ✓ Microscopie à épi-fluorescence
- ✓ Entrons dans la 3^{ème} dimension
- Imagerie multiphoton

Principes physiques de la microscopie multiphoton

Deux photons infrarouges (IR) se combinent pour exciter le fluorophore. Par contre, l'état excité, la relaxation et la fluorescence émise sont identique à une excitation monophoton



$$E_{\gamma} = hc/\lambda$$



Les photons doivent arriver dans une fenêtre de temps de l'ordre de 10^{-18} secondes (une **atto**seconde). Cette échelle de temps est compatible avec la durée de vie de cet état virtuel (10^{-17} secondes soit 0.01 **femto**seconde). Ils doivent également interagir avec le nuage électronique dans un espace de l'ordre de 10^{-12} cm³. La probabilité d'excitation biphoton est **10^{-30}** fois inférieure au monophoton !! (théorie par Maria Goppert-Mayer 1929 (prix nobel 1963))

Principes physiques de la microscopie multiphoton

La densité de photon permettant d'outrepasser cette probabilité quasi nulle n'est atteignable qu'avec des lasers pulsés (1980) et exclusivement au point focal (point de convergence). Chaque pulse extrêmement court (femtoseconde) contient énormément de photons (puissance par pulse (P crête) : plus de 100 kW) mais à l'échelle temporelle, reste rare : cinq ordres de grandeur entre la durée et l'occurrence des pulses.

Une femtoseconde (fs) est un millionième de milliardième de seconde ($1 \text{ fs} = 10^{-15} \text{ s}$).
En 1 s la lumière parcourt une distance proche de la distance terre-lune alors qu'en 100 fs elle parcourt l'épaisseur d'un cheveu ($300 \mu\text{m}$).

Faisceau continu

Puissance moyenne de 1 à 200 mW



Faisceau pulsé

Puissance moyenne de 1 à 5 W



$\tau = 10^{-13} \text{ s}$

Principes physiques de la microscopie multiphoton

Interactions matière/lumière

Absorption bi-photonique

$$E_{2\gamma} = P^2 / (\tau \cdot F)$$

Donc les conditions nécessaire à l'excitation bi-photonique implique une très haute densité de photons que ce soit

D'un point de vue spatial

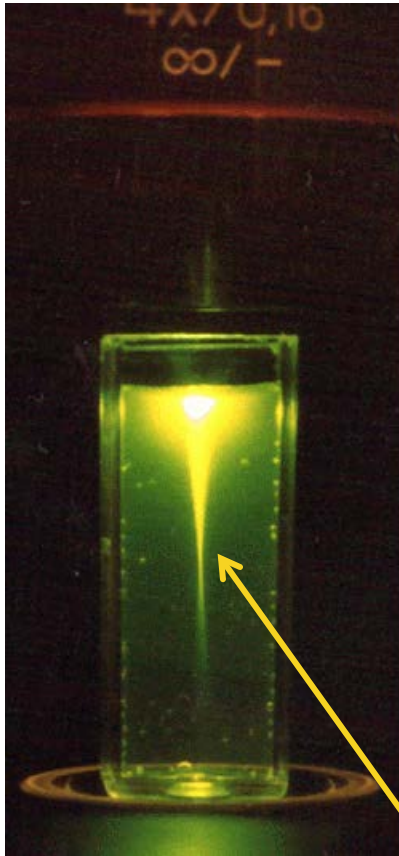
(concentration par la focalisation, l'ouverture numérique)

Et/ou d'un point de vue temporel

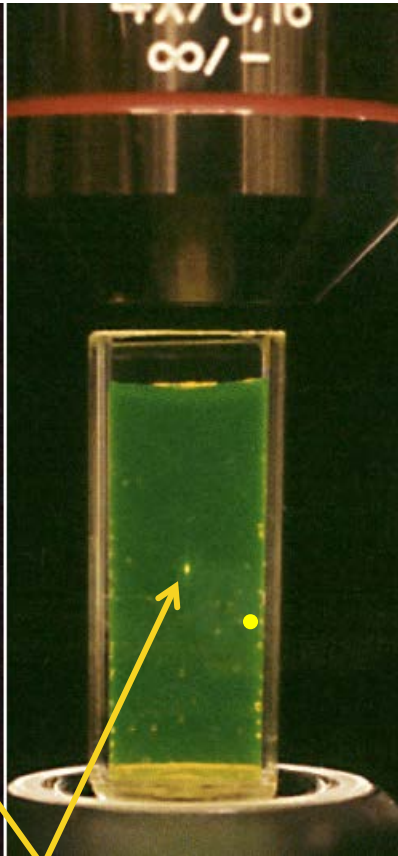
(source laser pulsé pico ou femtoseconde)

L'excitation bi-photonique est restreinte au point focal

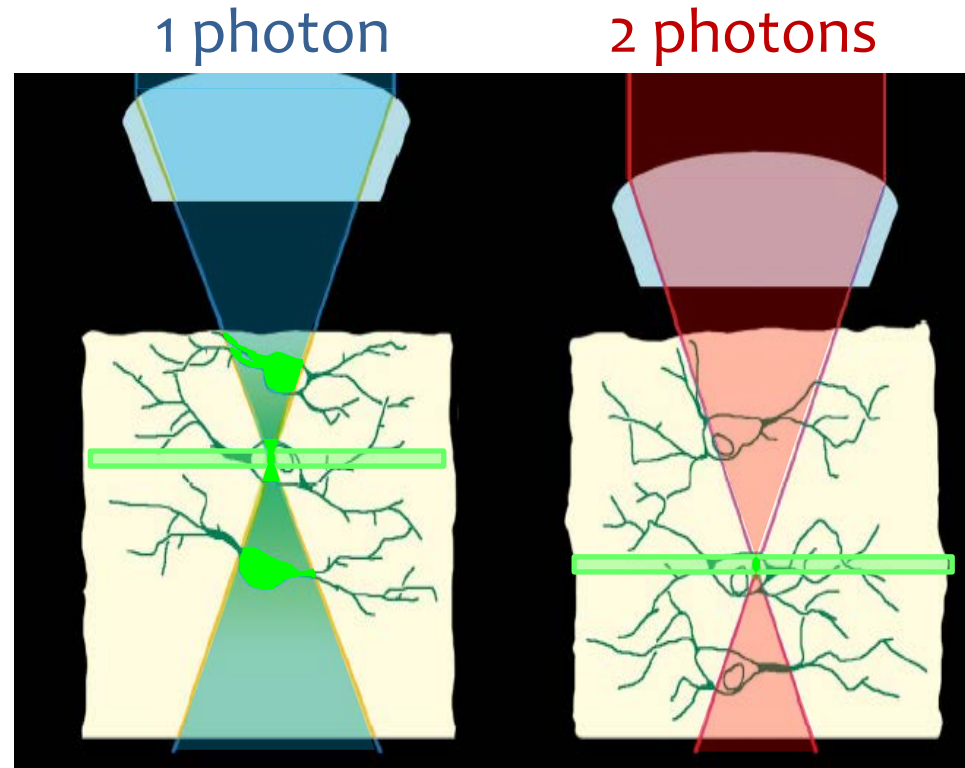
1 photon



2 photons



Point focal



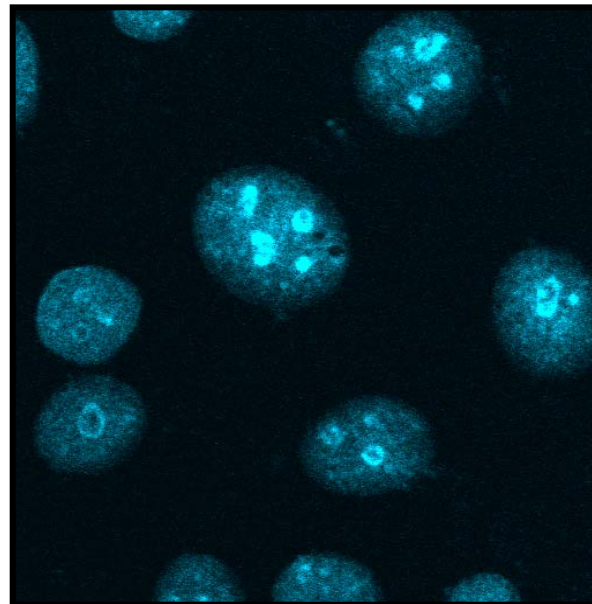
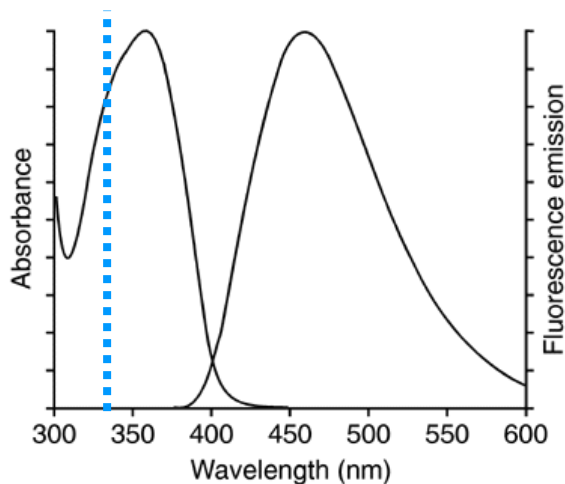
Le balayage induit une coupe optique intrinsèquement confocale, inutile d'enlever les photons hors focus (non générés).

Longueurs d'onde d'absorption optimales

	λ_{abs1} (nm)	λ_{abs2} (nm)
Bodipy	503	920
Cascade Blue	400	750
DAPI	350	700
Fluorescéine	492	780
Indo-1	350	700
Lucifer Yellow	430	860
Rhodamine B	545	840
Rhodamine 6G	526	795

Le spectre d'excitation biphoton n'est pas forcément le double point à point du spectre d'excitation monophoton (optique non-linéaire).

Excitation 3- photons Exemple : DAPI



Utilisation d'un laser
Dont la longueur
d'onde est fixe à
1030 nm : T-pulse
(Amplitude
Systems).

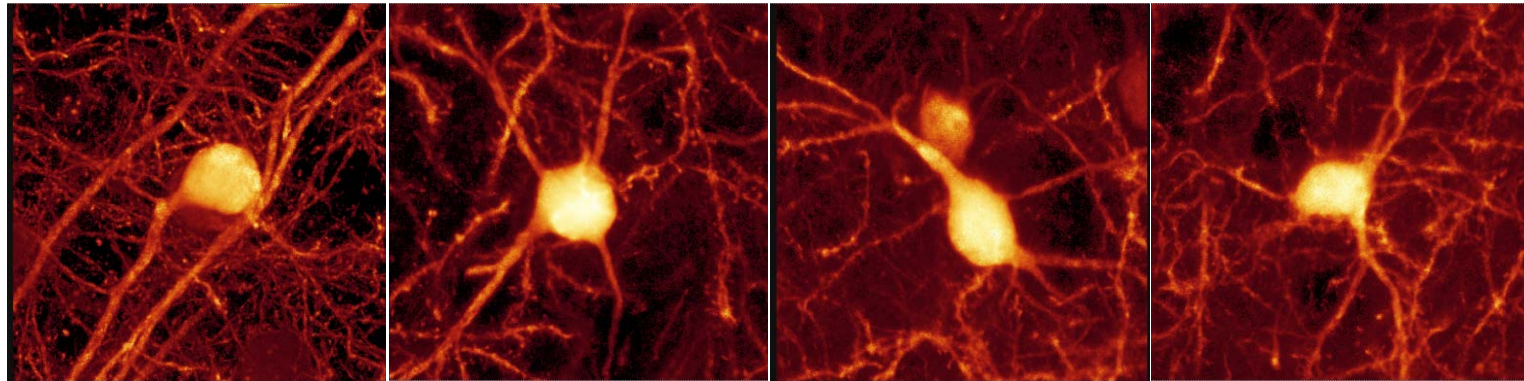
Imagerie bi-photon vs confocale

Faibles profondeurs : objectif 63X à huile

confocal

-meilleure
résolution

-meilleur rapport
signal/bruit



20 μm

40 μm

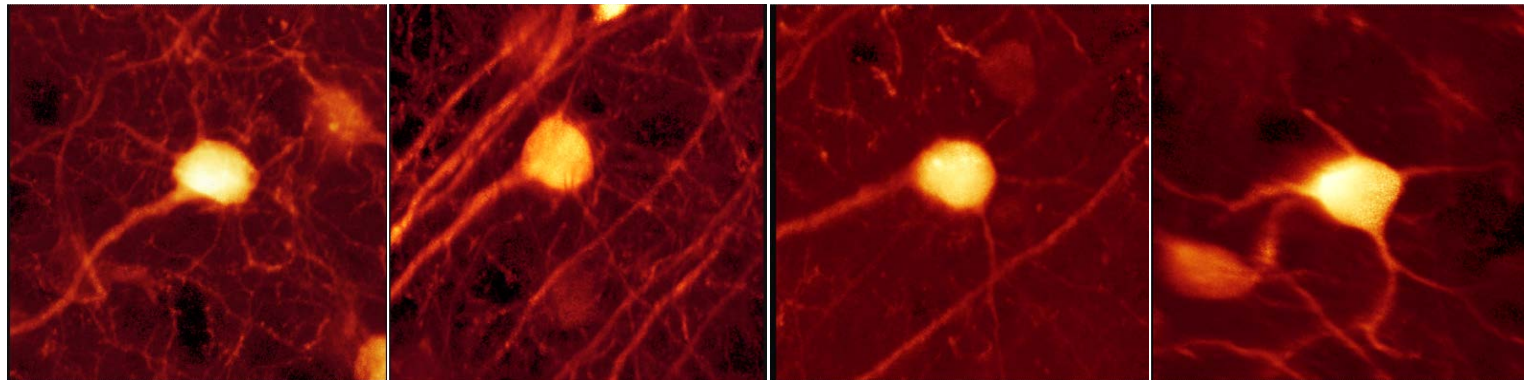
60 μm

80 μm

bi-photon

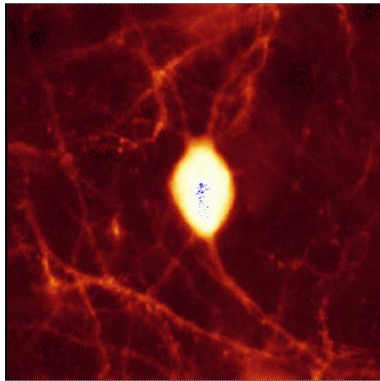
-plus de bruit

-coupes optiques
plus épaisses

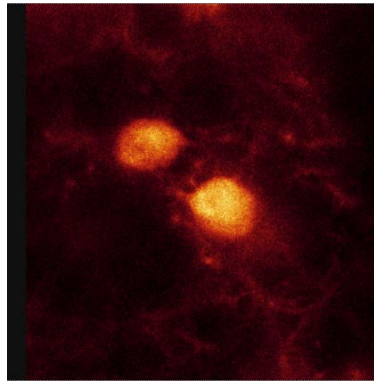


Imagerie bi-photon vs confocale

Pour des profondeurs plus importantes : objectif 63X à eau



100 μm



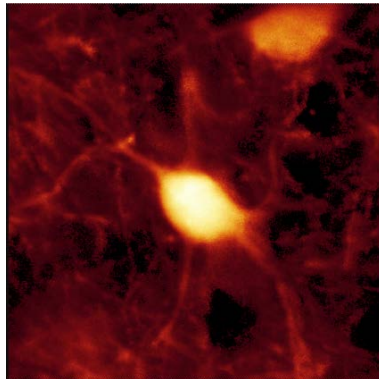
120 μm

confocal

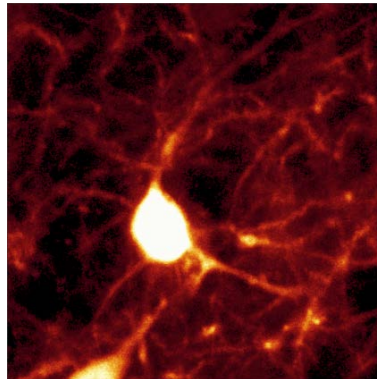
- augmentation de la puissance du laser
- augmentation du bruit

bi-photon

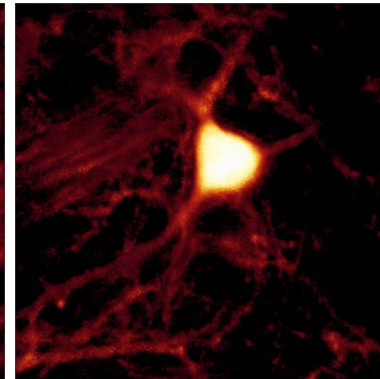
- augmentation de la puissance du laser
- acquisition plus facile qu'en confocal



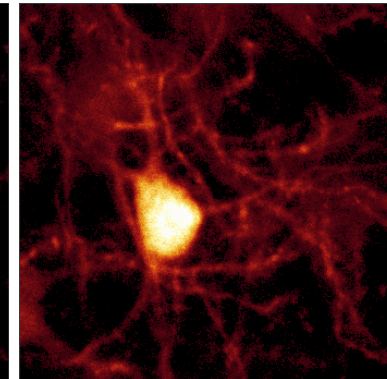
100 μm



140 μm



170 μm

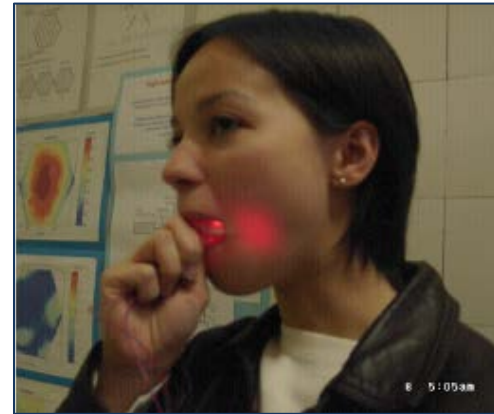


200 μm

Avantages du multiphoton

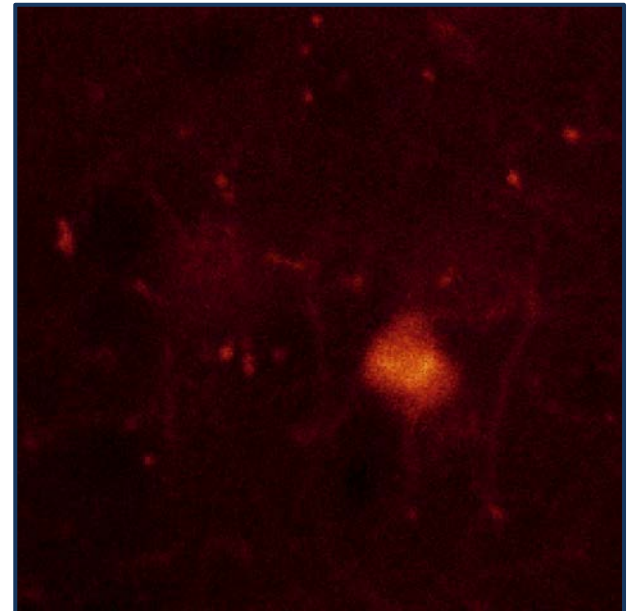
AVANTAGES

- Zone d'excitation plus faible (intrinsèquement confocale)
- Élimination quasi-totale de la fluorescence hors plan focal
- Moindre photo-blanchiment général et photo-toxicité
- Pénétration plus grande des IR dans les tissus (jusqu'à 1 mm)
- Excitation des fluorophores UV sans lumière UV
- Bonne séparation des lumières d'excitation et d'émission



INCONVENIENTS

- Photo-blanchiment au point focal
- Nécessité d'un important flux de photons
- Balance entre puissance et blanchiment délicate
- Coût et maintenance de l'appareillage lourd



Sources et Ressources

WEB divers

- Molecular expressions <http://micro.magnet.fsu.edu/index.html>
 - Microscopy U (Nikon) : <http://www.microscopyu.com>
- Microscopy resource system (Olympus): <http://www.olympusmicro.com/index.html>
- A whole world of microscopy knowledge (Zeiss): <http://zeiss-campus.magnet.fsu.edu/index.html>
 - Wikipédia

Plate-formes d'imagerie

- PICSL <http://www.picsl.univ-mrs.fr/> : MICROSCOPIE OPTIQUE (PDF indisponible)
- BIC <http://www.bic.u-bordeaux2.fr/> : Microscopie à épi-fluorescence et microscopie confocale (PDF)
- Membres du [GDR2588](#) CNRS (microscopie fonctionnelle des systèmes vivants) et du [RTmfm](#) (Réseau technique de microscopie de fluorescence multidimensionnelle).

Cours

- Arnaud Sergé (université de la Méditerranée – Marseille II)
 - Yves Husson (Université Joseph Fourier – Grenoble)
 - Serge Monneret (Institut Fresnel, Marseille)
 - Maxime Dahan (Laboratoire Kastler Brossel, ENS)
 - François Waharte (institut Curie, UMR144)

Handbooks

- Fondamentaux d'optique et d'imagerie numérique à l'usage des microscopistes (C Cibert, ed. Cépaduès)
 - Handbook of biological confocal microscopy, third edition (JB. Pawley ed. Springer)
 - Fundamentals of light microscopy and electronic imaging (DB. Murphy, ed Wiley-liss)

Commentaires, remarques, améliorations :
francois.michel@inserm.fr

