

Microscopie multiphoton illuminée par nappe : imagerie de fluorescence rapide et en profondeur dans les tissus vivants

Willy SUPATTO

Laboratoire d'Optique et biosciences, École polytechnique, CNRS UMR 7645, Inserm U696

willy.supatto@polytechnique.edu

L'un des défis de la microscopie photonique en biologie est de capturer l'évolution de tissus biologiques ou d'organismes vivants sans les perturber à des échelles multiples, avec une très grande résolution spatiale et temporelle et une grande profondeur d'imagerie. Dans ce contexte, un enjeu est de développer des microscopes capables d'imager à la fois vite et en profondeur dans des organismes vivants. Tandis que la microscopie multiphoton est une référence pour l'imagerie en profondeur, le développement récent de la microscopie illuminée par nappe a montré des résultats spectaculaires d'imagerie rapide *in vivo*. La microscopie multiphoton illuminée par nappe est une nouvelle approche combinant ces propriétés : elle permet l'imagerie *in vivo* rapide et en profondeur.

Imagerie en profondeur : les avantages de la microscopie 2PEF à balayage point par point

En microscopie photonique, la profondeur d'imagerie dans les tissus biologiques est limitée par leurs propriétés optiques (diffusion, absorption, aberrations) qui dégradent la qualité des images obtenues (signal, résolution, contraste) après avoir traversé une certaine épaisseur de tissu. Depuis son introduction en 1990, la microscopie basée sur la fluorescence excitée à deux photons (2PEF, voir encadré) s'est imposée comme la technique de fluorescence la plus efficace pour imager en profondeur dans les tissus biologiques [1]. Elle a trouvé de nombreux domaines d'application en biologie (neurosciences, immunologie, biologie du développement...). Comme la microscopie confocale (*figure 1a*), l'instrument standard de microscopie 2PEF utilise un balayage point par point du volume focal dans l'échantillon (*figure 1d*) pour reconstituer une image tridimensionnelle. Comme dans la majorité des micro-

scopes, ces techniques utilisent une géométrie colinéaire où les axes optiques d'illumination et de détection sont alignés (*figure 2a*). Par rapport à la microscopie confocale, la microscopie 2PEF à balayage point par point permet une profondeur d'imagerie typiquement deux fois supérieure dans les tissus diffusants. Cette performance repose sur trois avantages :

- Une meilleure pénétration du faisceau d'illumination : la lumière infrarouge utilisée en microscopie 2PEF pour exciter les fluorophores est moins diffusée dans les tissus biologiques que la lumière visible utilisée en microscopie confocale. Cela permet une meilleure pénétration dans les tissus et une dégradation moins rapide du volume focal en profondeur.

- Un confinement robuste de la fluorescence émise : la fluorescence 2PEF dépendant quadratiquement de l'intensité d'illumination (*voir encadré*), elle n'est produite que dans les régions où l'intensité d'illumination est suffisamment forte. Ainsi, la fluorescence est confinée spatialement de façon robuste et est moins sensible à la diffusion du faisceau d'illumination.

- Une détection plus efficace de la fluorescence émise : en microscopie 2PEF à balayage point par point, l'ensemble de la fluorescence est émise par un volume confiné spatialement (voir encadré) et correspondant à un pixel unique dans l'image. Ainsi, tous les photons émis par l'échantillon, qu'ils soient balistiques ou diffusés par les tissus (entre le volume focal et le détecteur) sont collectés et contribuent au signal. Il s'agit d'une efficacité de collection unique puisque dans toutes les autres techniques, seuls les photons balistiques (ou non diffusés) contribuent au signal. En microscopie confocale notamment, les photons non balistiques sont rejetés par une micro-pupille (*pinhole*).

La microscopie utilisant un balayage point par point (2PEF ou confocale) présente une vitesse d'acquisition lente (typiquement moins de 1 image/s ou 10^6 pixels/s) puisque les images sont construites pixel par pixel. Cette vitesse est un facteur limitant dans de nombreuses applications biologiques, en particulier lorsque des systèmes vivants et dynamiques sont étudiés.

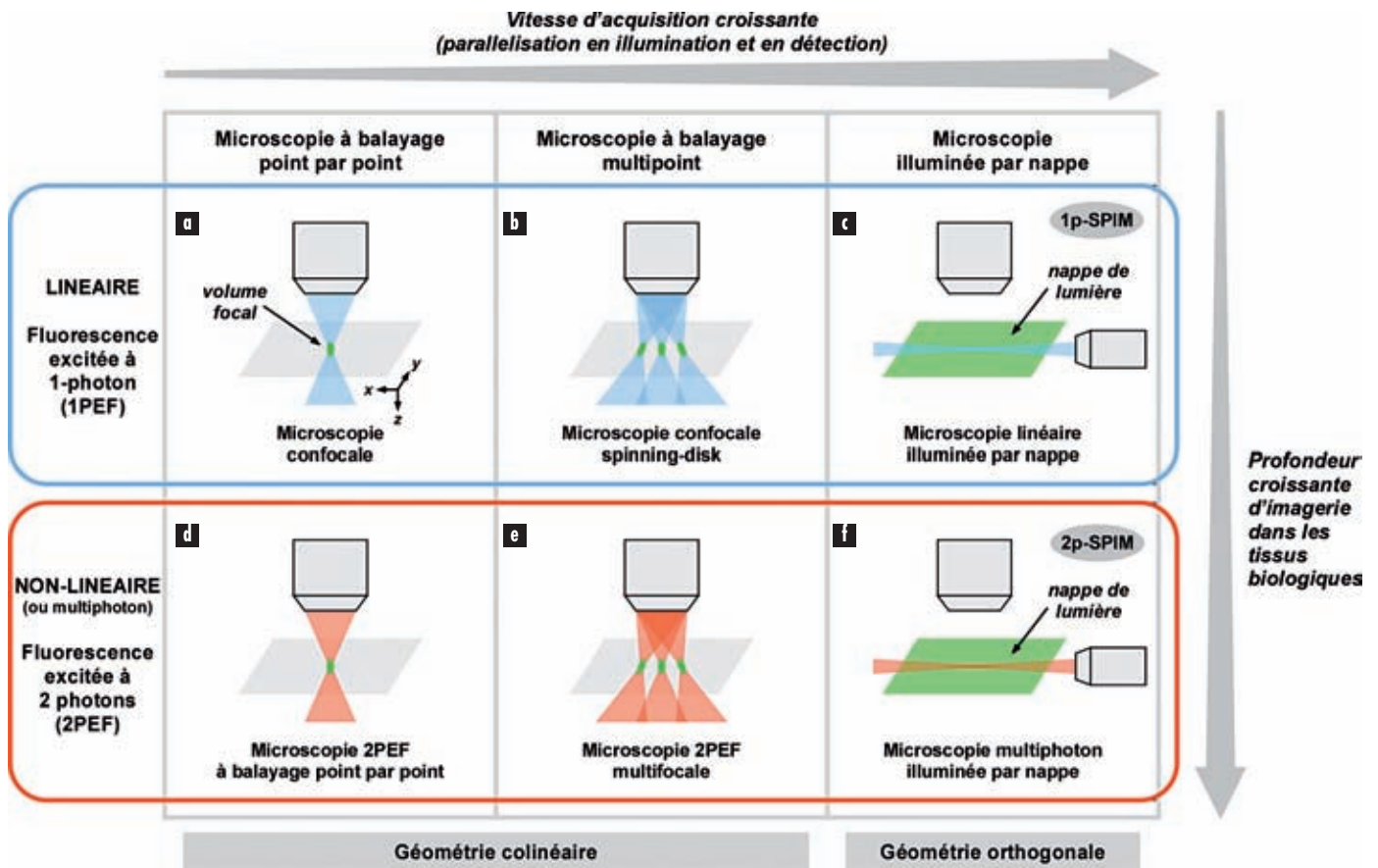


Figure 1. Les techniques de microscopie de fluorescence et les stratégies pour améliorer vitesse d'acquisition et profondeur d'imagerie.

Imagerie rapide : illumination par nappe, une parallélisation ultime

Parallélisation en géométrie colinéaire

Depuis une quinzaine d'années, plusieurs approches ont été explorées pour améliorer la vitesse d'acquisition en microscopie multiphoton, souvent de façon similaire à ce qui avait été proposé en microscopie linéaire (figure 1). Tout d'abord, la vitesse de balayage point par point peut être augmentée en utilisant, par exemple, un scanner résonant ou un déflecteur acousto-optique. La vitesse d'acquisition utile est cependant limitée par le signal qui peut être obtenu pendant la durée d'acquisition d'un pixel sans causer de saturation des fluorophores ou de dommages photo-induits. En pratique, le temps minimal d'accumulation du signal par pixel dans de bonnes conditions est de l'ordre de 1 μ s, correspondant à une vitesse d'acquisition de 10⁶ pixels/s. Pour

contourner cette limite fondamentale, la principale stratégie consiste à paralléliser l'illumination de l'échantillon et la détection du signal. Avec une excitation multifocale (figure 1b et 1e), la vitesse d'acquisition globale peut être augmentée tout en gardant le même temps d'illumination par pixel. Néanmoins, l'augmentation de la vitesse d'acquisition demande une augmentation proportionnelle de la puissance moyenne d'illumination. En microscopie multiphoton, la puissance laser disponible est souvent très vite atteinte. De plus, l'augmentation de la puissance d'illumination peut vite devenir destructrice pour l'échantillon.

Parallélisation en géométrie orthogonale : la microscopie illuminée par nappe

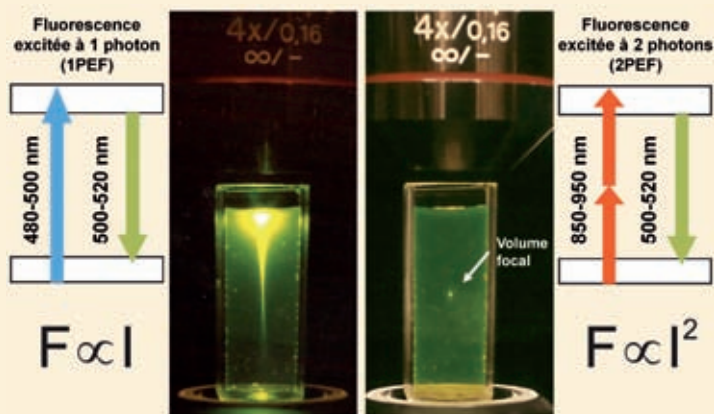
Alors que la majorité des techniques actuelles de microscopie utilise une géométrie colinéaire (figure 2a), Siedentopf et Zsigmondy proposaient il y a plus d'un siècle une géométrie orthogonale, où

l'axe d'illumination est orthogonal à l'axe de détection (figure 2b). Cette géométrie permet d'obtenir un sectionnement optique en illuminant l'échantillon avec une fine nappe (ou feuille) de lumière perpendiculaire à l'axe de détection. La résolution axiale (suivant z dans la figure 2b) est déterminée par l'épaisseur de la nappe. L'approche consistant à illuminer un échantillon avec une nappe perpendiculaire à la détection est très générale : par exemple, en hydrodynamique, la vélocimétrie par image de particule utilise ce principe [2]. Pourtant, son utilisation en microscopie de fluorescence pour imager des systèmes biologiques vivants connaît un essor depuis moins de 10 ans [3]. Le développement rapide de cette technique (figure 1c) a conduit à l'apparition de nombreux noms et acronymes dans la littérature qui rendent difficile son identification : SPIM (*selective plane illumination microscopy*), OPFOS (*orthogonal plane fluorescence optical sectioning*), ou LSM

La fluorescence excitée à deux photons (2PEF)

Le terme de microscopie multiphoton (ou non-linéaire) regroupe l'ensemble des techniques d'imagerie optique basées sur une interaction non-linéaire de la lumière avec l'échantillon. La technique la plus répandue est la microscopie 2PEF (2-photon excited fluorescence), aussi appelée « microscopie 2 photons » ou « biphotonique » [1]. Contrairement aux techniques conventionnelles de microscopie de fluorescence comme la microscopie confocale (figure 1a), en microscopie 2PEF, les chromophores sont excités par l'absorption simultanée de deux photons dont l'énergie est deux fois plus faible que celle normalement requise lors de l'absorption à un photon. Ainsi, des photons dans le proche infrarouge peuvent provoquer des transitions dans le domaine visible ou ultraviolet et

induire de la fluorescence dans le visible. La probabilité d'occurrence d'événements non-linéaires étant faible, l'excitation à deux photons nécessite une intensité lumineuse instantanée élevée. Par ailleurs, il est important de garder une intensité moyenne raisonnable pour ne pas perturber l'échantillon. Ces deux conditions sont obtenues grâce à l'utilisation de laser infrarouge en régime impulsif avec des impulsions ultra-brèves (de l'ordre de 100 fs). Lorsque la lumière excitatrice est focalisée par un objectif, la probabilité d'absorption à deux photons, ayant une dépendance quadratique en intensité, n'a lieu qu'au voisinage du point de focalisation. Ainsi, contrairement au cas de l'absorption à un photon, toute la fluorescence émise provient exclusivement du volume focal.



Principe de fluorescence excitée à deux photons (d'après Zipfel et Webb, Cornell University).

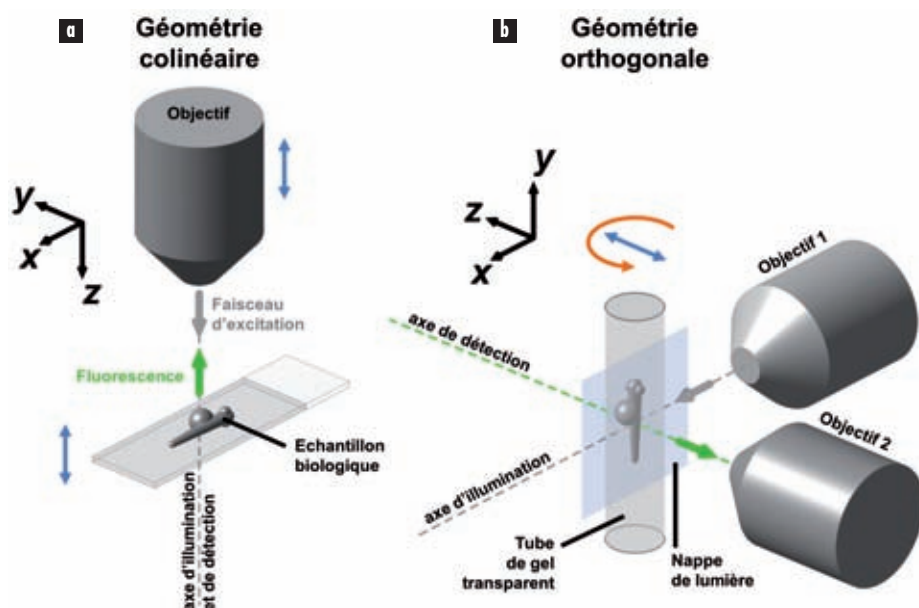
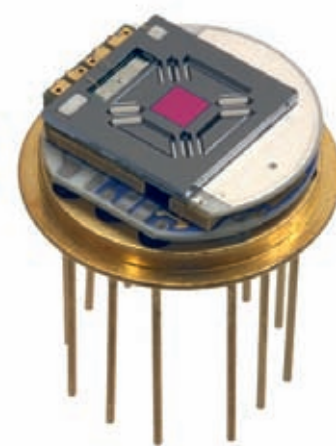


Figure 2. Microscopie avec une géométrie colinéaire (a) ou orthogonale (b).

InfraTec

Microspectromètre



Détecteur Pyroélectrique
Rapide avec Filtre
Fabry-Pérot Intégré

LASER COMPONENTS

Détecteurs

- Accordable de 3.0 à 4.1 μm , ou de 3.9 à 4.8 μm
- **NOUVEAU**: maintenant accordable dans la gamme de 8.0 à 10.5 μm
- Commande électrostatique μm
- Résolution

www.lasercomponents.fr

(*light-sheet fluorescence microscopy*). Nous utiliserons par la suite l'acronyme 1p-SPIM pour désigner la microscopie illuminée par nappe avec une excitation linéaire. L'avantage principal de l'illumination par nappe est la parallélisation de l'excitation qui permet une vitesse d'acquisition pouvant facilement dépasser 10^7 pixels/s sans perturber le système biologique imagé. La principale limite est la profondeur d'imagerie. Du côté de l'illumination, l'excitation linéaire conduit à une dégradation rapide du sectionnement optique en profondeur dans un tissu biologique : la lumière étant diffusée, l'épaisseur de la nappe s'élargit en profondeur et conduit à une dégradation de la résolution axiale. Du côté de la détection, comme en microscopie confocale, seuls les photons balistiques (non-diffusés) contribuent au signal, et les photons diffusés dégradent l'image.

Dans ce contexte, un nouveau compromis entre profondeur d'imagerie et vitesse d'acquisition a été proposé dans le groupe du Pr. Scott E. Fraser au California Institute of Technology et au Laboratoire d'Optique et biosciences à l'École polytechnique avec la microscopie 2PEF illuminée par nappe (*figure 1f*) [4,5], que nous désignons par 2p-SPIM.

Microscopie multiphoton illuminée par nappe (2p-SPIM)

Principe

Le dispositif 2p-SPIM que nous avons utilisé [4,5] est schématisé à la *figure 3*. Une nappe de lumière est engendrée en balayant rapidement (suivant la direction y) un faisceau gaussien faiblement focalisé. Le plan illuminé est imagé suivant la direction orthogonale (direction z) par un objectif de détection sur une caméra EM-CCD. L'illumination par un laser femtoseconde à 940 nm permet l'excitation à deux photons d'une protéine fluorescente verte (GFP) dans l'échantillon biologique. Comparé à l'utilisation d'une lentille cylindrique pour engendrer la nappe de lumière, le balayage rapide d'une ligne permet d'obtenir un signal 2PEF beaucoup plus intense [4]. Enfin, le champ de vue étant limité par l'extension

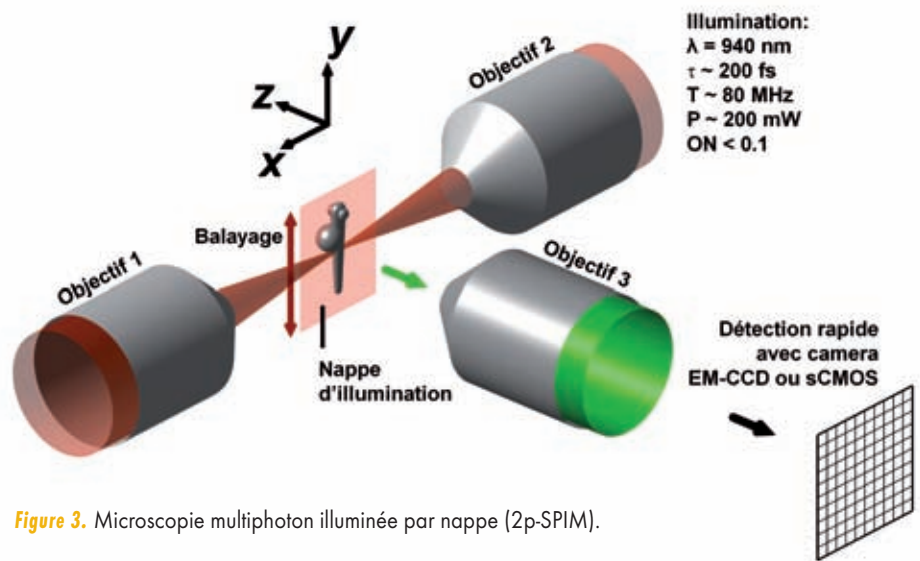


Figure 3. Microscopie multiphoton illuminée par nappe (2p-SPIM).

du volume focal d'excitation (suivant la direction x), correspondant à environ $200 \mu\text{m}$ dans ce cas, une illumination bidirectionnelle a été utilisée afin de doubler la taille du champ de vue dans la direction x . Le dispositif décrit à la *figure 3* permet une résolution axiale d'environ $2 \mu\text{m}$.

2p-SPIM : plus rapide que la microscopie 2PEF à balayage point par point

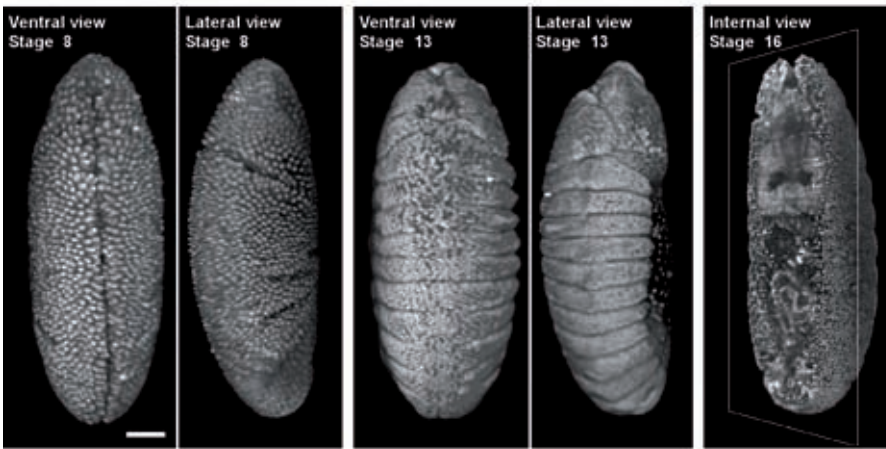
Parmi les stratégies utilisées pour augmenter la vitesse d'acquisition en microscopie 2PEF, la microscopie 2p-SPIM introduit un nouveau paradigme. En effet, elle est la seule approche permettant une augmentation de la vitesse globale d'imagerie tout en permettant une longue accumulation du signal par pixel et en utilisant de faibles intensités crêtes d'illumination. Cette propriété fondamentale résulte de la géométrie orthogonale qui permet l'utilisation d'une faible focalisation de l'illumination sans perte de résolution axiale ni de signal fluorescent accumulé [4]. La faible focalisation de l'illumination a plusieurs avantages déterminants pour l'imagerie in vivo. Tout d'abord, elle produit des intensités crêtes faibles qui réduisent les dommages photo-induits. Contrairement aux techniques reposant sur une géométrie colinéaire, en 2p-SPIM, la parallélisation de l'excitation est obtenue le long de la direction de propagation de l'illumination (*figure 3*, direction x) en réutilisant la même énergie lumineuse. Ceci permet notamment d'utiliser beaucoup moins de puis-

sance laser que les approches multifocales (*figure 1e*). Finalement, la faible focalisation de l'illumination est moins sensible aux aberrations optiques induites par l'échantillon biologique, et la dégradation de résolution en profondeur est moins prononcée. Nous avons pu démontrer en imageant le développement de l'embryon de drosophile (*figure 4a*) que la microscopie 2p-SPIM permet une acquisition rapide tout en réduisant les dommages photo-induits avec une augmentation raisonnable de puissance laser. L'imagerie in vivo du cœur de poisson zèbre (*figure 4b*) montre, à notre connaissance, l'acquisition la plus rapide en microscopie multiphoton, avec plus de 10^7 pixels/s.

2p-SPIM : une plus grande profondeur d'imagerie que la microscopie 1p-SPIM

En ce qui concerne la profondeur d'imagerie, la microscopie 2p-SPIM conserve les deux premiers avantages de la microscopie 2PEF à balayage point par point présentés plus hauts : une bonne pénétration du faisceau d'illumination et de la nappe de lumière dans les tissus biologiques et un confinement robuste de la fluorescence émise limitée à la partie la plus fine de la nappe en profondeur. Dans les échantillons biologiques, ces avantages permettent d'imager environ deux fois plus profondément suivant la direction d'illumination qu'en microscopie linéaire illuminée par nappe (1p-SPIM). En particulier, la résolution axiale (*figure 3*, direction z) est mieux conservée [4]. Il est

a Imagerie 2p-SpIM de l'ensemble du développement d'un embryon de drosophile



b Imagerie 2p-SpIM du coeur d'un embryon de poisson zèbre (70 images/s, >10⁷ pixels/s)

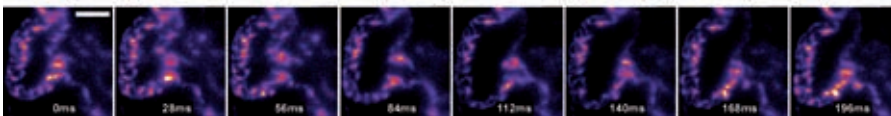


Figure 4. Exemples d'application de la microscopie 2p-SpIM (d'après [4]).

important de noter que la détection plein champ en 2p-SpIM supprime le troisième avantage cité plus haut : l'efficacité de collection de la microscopie 2PEF à balayage point par point permet quant à elle une profondeur d'imagerie légèrement supérieure.

Des résultats prometteurs

Parmi les approches en microscopie de fluorescence proposées pour améliorer vitesse d'acquisition et profondeur d'imagerie dans les tissus biologiques, tout en limitant les dommages photo-induits, la microscopie 2p-SpIM tient une place singu-

lière, avec des résultats prometteurs [4,5]. Les nombreuses directions possibles pour optimiser davantage cette approche, notamment concernant la détection du signal fluorescent, promettent de fructueuses applications en biologie.

Remerciements

Je tiens à remercier mes collaborateurs impliqués dans le développement de la microscopie 2p-SpIM : *Thai V. Truong, David S. Koos, John M. Choi et Scott E. Fraser au California Institute of Technology, ainsi que Pierre Mahou, Jean-Marc Sintès et Emmanuel Beaurepaire au laboratoire d'Optique et biosciences à l'École polytechnique.*

Références

[1] Zipfel W, Williams R, et Webb W, Nonlinear magic: multiphoton microscopy in the biosciences, Nature Biotechnology (2003).
 [2] Knapp Y et Bertrand E, Micro-vélocimétrie par image de particules, Photoniques N°57 (2012).
 [3] Huisken J, Swoger J, Del Bene F, Wittbrodt J, et Stelzer EH, Optical sectioning deep inside live embryos by selective plane illumination microscopy, Science (2004).
 [4] Truong TV, Supatto W, Koos DS, Choi JM, et Fraser SE, Deep and fast live imaging with two-photon scanned light sheet microscopy, Nature Methods (2011).
 [5] International patent application PCR/US2010/ 054760: Multiple-photon excitation light-sheet illumination microscope (2010).

Micro positionnement pour l'usage laser

Les contrôleurs, les platines et les systèmes Aerotech augmentent la précision et le rendement de votre application tout en maximisant les temps de bon fonctionnement.

PRO Series



Platines linéaires

- Courses de 50 à 1500mm
- Vitesse jusqu'à 2m/s
- Conçus avec des joints latéraux et un capot de protection en tôle
- Entraînement à vis à bille ou à moteur linéaire



CCS

Rotation à entraînement direct

- Mandrin à serrage et desserrage pneumatique
- Collet captif minimise les défauts axiaux pendant le serrage/desserrage
- Ouverture central pour alimentation
- Moteur brushless et codeur dans l'axe



Gantry XYAB étanche

Systèmes Gantry à moteurs linéaires

- Vitesse de 3m/s et accélération de 5g
- Précision exceptionnelle, haut rendement et grande productivité
- Versions étanches et options customisées pour votre application



Plateformes contrôleurs avancés

- Mono et multiaxes
- Fonctions de contrôle avancées et software modulaire
- Environnement d'automatisme embarqué PLC

Télécharger notre brochure de solution pour process laser sur www.aerotech.com



Dedicated to the Science of Motion
 Aerotech France, BP 70043
 45702 Villemandeur Cedex
 Ph: +33 238970830
 Email: ventes@aerotech.com

www.aerotech.com

ATO412A-FR