

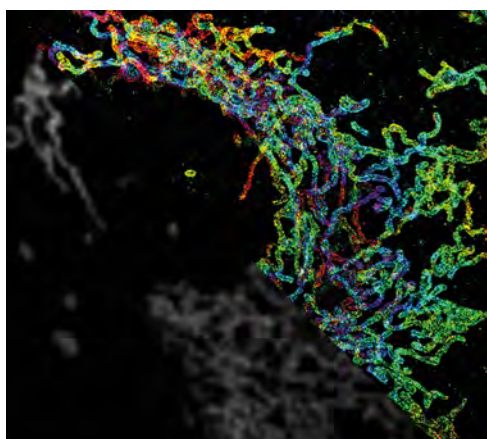
LOCALISATION NANOMÉTRIQUE DE MOLÉCULES UNIQUES PAR MODULATION DU SIGNAL DE FLUORESCENCE

Abigail ILLAND¹, Pierre JOUCHET¹, Emmanuel FORT², Sandrine LÉVÊQUE-FORT¹

¹Institut des sciences Moléculaires d'Orsay, Université Paris Saclay, CNRS, 91405 Orsay

²Institut Langevin, ESPCI, Université PSL, 75005 Paris

*sandrine.leveque-fort@universite-paris-saclay.fr



La microscopie de localisation de molécules individuelles permet de dépasser la limite de diffraction, révélant ainsi l'organisation cellulaire à l'échelle nanométrique. Cette méthode reposant sur l'analyse spatiale du signal émis par les molécules, reste souvent limitée à l'observation d'objets biologiques à de faibles profondeurs, ou très peu aberrants. Nous montrons ici que l'introduction d'un paramètre temporel dans le processus de localisation *via* l'introduction d'une excitation modulée permet d'adresser ces limitations.

<https://doi.org/10.1051/phys/202211430>

Article publié en accès libre sous les conditions définies par la licence Creative Commons Attribution License CC-BY (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0>), qui autorise sans restrictions l'utilisation, la diffusion, et la reproduction sur quelque support que ce soit, sous réserve de citation correcte de la publication originale.

La microscopie à localisation de molécules uniques (SMLM) est une méthode d'imagerie de fluorescence qui contourne la limite de diffraction et permet ainsi d'atteindre des résolutions spatiales de l'ordre de 10-50 nm, contre plusieurs centaines de nanomètres pour les méthodes d'imagerie optiques classiques [1,2]. Cette approche d'imagerie de fluorescence repose sur la détection et la localisation de

molécules uniques dans le volume focal du microscope et qui émettent de manière aléatoire au cours du temps. En effet même si l'image d'une molécule fluorescente isolée dans l'échantillon est convoluée avec la réponse percussive du système optique et en particulier de l'objectif, et correspond donc à une tache limitée par la diffraction sur la caméra, également appelée PSF (*Point Spread Function*), il est possible de retrouver le barycentre de la tache confondu avec la position

de la molécule en appliquant un modèle d'ajustement de cette PSF (typiquement un modèle gaussien). La position transverse (x,y) de l'émetteur fluorescent peut être extraite avec une précision bien en deçà de la limite de diffraction et qui dépend principalement du nombre de photons (N) émis par la molécule $\sigma_{x,y} \sim \sigma_{PSF} / \sqrt{N}$ mais également de la taille de la PSF. On cherchera ainsi à utiliser des molécules fluorescentes émettant un nombre important de photons, et des objectifs à très

grande ouverture numérique (> 1.3) afin de bénéficier d'une taille de PSF réduite et d'une collection de fluorescence efficace. Ce principe de localisation permettant de suivre le déplacement de molécules individuelles dès les années 1980, a dû attendre l'apparition de nouvelles stratégies photophysiques (PALM, STORM, DNA-PAINT) pour être appliqué à l'observation de structures biologiques marquées avec un grand nombre de molécules fluorescentes, et ainsi les contraindre à ne pas émettre simultanément mais de manière aléatoire afin de permettre la localisation de chacune d'entre elles de façon décalée dans le temps et l'espace. Ainsi, dans chaque image acquise, seule une sous-population de molécules individuelles est détectée et localisée, ce qui impose typiquement d'acquérir entre 10000 à 40000 images afin de sonder l'ensemble de la structure et de reconstruire en temps réel ou en post-traitement l'image super-résolue finale (cf Fig. 1 a-b). Ce processus de localisation ne donnant accès qu'à une information spatiale transverse (x,y), des stratégies complémentaires doivent être mises en place afin de localiser la position des molécules suivant l'axe optique (z). Les méthodes principalement utilisées reposent sur une mise en forme de la PSF afin de briser sa symétrie axiale comme l'introduction d'astigmatisme (cf. Fig.1c,d-g). Simple à mettre en œuvre, cette approche nécessite une calibration axiale rigoureuse pour associer les déformations induites à des positions axiales qui s'estompent très vite lors d'observation en profondeur. D'autres familles de mise en forme de PSF ont été développées afin d'étendre les performances aussi bien en termes de profondeur d'observation que de précision axiale qui tend à varier dans le volume d'observation (cf. Fig.1g) [3]. L'utilisation de la lumière supercritique peut également apporter intrinsèquement cette information axiale mais est limitée en profondeur d'observation à 500-600 nm et s'adapte particulièrement bien au suivi des structures d'adhésion cellulaires [4]. Lors du processus de localisation aussi bien transverse qu'axiale, toute déformation

de la PSF induite par exemple par un simple defocus ou des aberrations plus complexes liées à l'échantillon affecte la précision de localisation. L'analyse de la PSF basée uniquement sur des paramètres spatiaux impacte ainsi aussi bien la localisation 2D que 3D mais aussi la capacité à observer en profondeur les échantillons. Nous avons donc proposé l'insertion d'un paramètre temporel afin d'extraire l'information de localisation avec une précision accrue et uniforme dans la profondeur d'observation. En particulier nous nous sommes inspirés d'une méthode utilisant des propriétés spatiales de l'illumination pour réaliser le suivi du signal de diffusion d'une bille de polystyrène dans un motif d'excitation structuré créé par des interférences déplacées temporellement sur l'échantillon [5]. L'excitation modulée temporellement induit une diffusion également modulée dont la phase traduit la position de la molécule. Cependant ce dispositif destiné à observer un seul objet dans le champ d'observation permettait l'utilisation d'une photodiode et d'une détection synchrone, afin d'extraire la phase du signal modulé de l'objet et d'en extraire l'évolution de sa position dans le champ d'observation. Nous avons donc récemment revisité ce concept pour l'adapter à l'observation de structures biologiques *via* la localisation de molécules fluorescentes uniques, ce qui impose le développement d'une détection synchrone compatible avec l'acquisition d'un champ large *via* une caméra, et impliquant un nombre de photons de fluorescence limité associé à des événements d'émission stochastique au cours de l'acquisition. Cette nouvelle approche de microscopie, appelée ModLoc (*Modulated Localization*), permet d'extraire sur un large champ (typiquement de $50 \mu\text{m} \times 50 \mu\text{m}$) la position des molécules avec une précision de localisation accrue d'un facteur 2.4 suivant la direction d'application de la modulation [6].

En pratique, l'excitation de l'échantillon uniforme est remplacée par un motif d'excitation sinusoïdal balayé dans une direction (cf. Fig.1h). Par exemple dans le cas de la direction transversale ●●●

The Big Lift

HASO LIFT272

272x200 phase points
20 Hz max frame rate



HASO LIFT680

680x504 phase points
30 Hz max frame rate

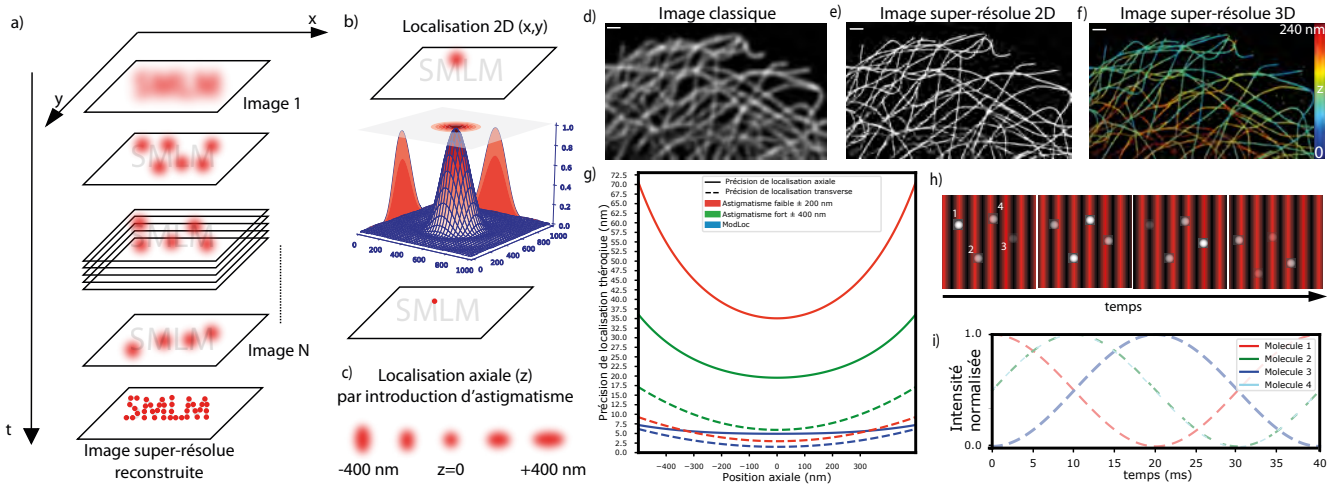


sales@imagine-optic.com
+33 164 861 560



www.imagine-optic.com

imagine  optic



x avec une fréquence de modulation temporelle Ω et un pas spatial Λ , elle s'écrit sous la forme :

$$I(x,t) = I_0 \left(1 + m \cos \left(\frac{2\pi}{\Lambda} x + \Omega t \right) \right) \quad (1)$$

Avec I_0 étant l'intensité lumineuse moyenne sur l'ensemble du champ et m étant le contraste du motif d'illumination. Dans le régime d'excitation linéaire, le signal de fluorescence d'une molécule est proportionnel à l'intensité lumineuse reçue et induit un flux de photons $N(x,t)$ pour une molécule éclairée par le champ d'excitation de l'équation (1) placée à la position x donné par

$$N(x,t) = N_0 \left(1 + m \cos \left(\Phi(x) + \Omega t \right) \right) \quad (2)$$

avec $\Phi(x) = \frac{2\pi}{\Lambda} x$ et où N_0 est le flux moyen de photons détectés associé à une intensité d'illumination I_0 . Le signal modulé dans le temps porte alors une information sur la position de la molécule dans sa phase $\Phi(x)$. La Figure 1h et 1i schématisent la variation temporelle de l'excitation de molécules fluorescentes situées dans un champ d'excitation sinusoïdal et les signaux de fluorescence induits. La démodulation du signal de fluorescence permettant de remonter à la phase de chaque molécule peut être obtenue en synchronisant 4 positions des franges sur l'échantillon avec l'acquisition de 4 points d'échantillonnage temporel du signal d'intensité de fluorescence modulée sur la caméra (cf Fig.2 a).

Figure 1. a) Principe de localisation de molécules uniques, où seulement une sous-population est observée afin de permettre la localisation successive dans un grand nombre d'images.

b) La position transverse (x,y) de la molécule est obtenue par un ajustement typiquement *via* un modèle gaussien.

c) La position axiale est obtenue par une méthode complémentaire comme l'introduction d'un astigmatisme. d,e,f) Images d'un réseau de microtubules dans une cellule respectivement en microscopie classique, microscopie super-résolue 2D (STORM), et microscopie super-résolue 3D où la fausse couleur code le z obtenu par astigmatisme.

g) Précision avec laquelle les molécules peuvent être positionnées aussi bien transversalement qu'axialement pour différentes valeurs d'astigmatismes, et qui montre leurs variations dans la profondeur d'observation.

À contrario, la technique développée (ModLoc) permet de bénéficier d'une précision uniforme. h) dans la technique ModLoc l'introduction d'une excitation structurée déplacée sur l'échantillon permet d'induire i) un signal de fluorescence modulé dont la phase sera extraite par une mesure de typiquement 4 valeurs.

Dans la figure 1i-h, on peut voir que les molécules situées à différentes positions dans le champ ont des phases différentes, mais que certaines molécules (2 et 4) peuvent présenter des phases identiques du fait de la périodicité du signal de modulation. Afin d'extraire la position finale dans le champ d'observation, on associe une analyse gaussienne sur l'image permettant d'identifier dans quelle frange se situe la molécule, à l'information de phase localisant précisément la molécule dans la frange. Les bornes de Cramer Rao (CRLB), qui donnent accès à la précision théorique de localisation accessible pour cette méthode dans le cas d'une démodulation en 4 points, sans signal de bruit de fond et pour

un contraste d'excitation maximal, s'écrit :

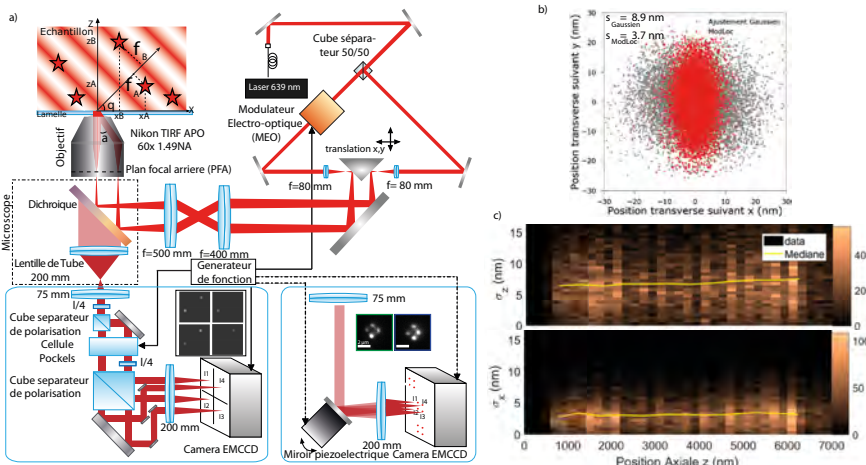
$$\Delta_x = \frac{\sigma_{PSF}}{\sqrt{N(1 + \frac{4\pi^2 \sigma_{PSF}^2}{\Lambda^2})}} \quad (3)$$

Où on voit que le pas du motif d'excitation impacte la précision de localisation. Le dispositif expérimental (Fig. 2-a) est basé sur une excitation sinusoïdale créée en faisant interférer deux faisceaux dans l'échantillon biologique. Le modulateur électro-optique permet le déplacement des interférences sur l'échantillon typiquement à 1.2 kHz. Les caractéristiques temporelles du signal de fluorescence imposent des contraintes spécifiques aux stratégies de démodulation, car les molécules ne restent actives que sur des

temps très courts (typiquement autour de 15-20 ms) et apparaissent/disparaissent de façon aléatoire au cours de l'acquisition. Ceci ne permet pas l'obtention des 4 valeurs d'intensité par une acquisition séquentielle d'images qui serait trop lente avec les caméras actuellement utilisées et environ 30 % des événements ne pourraient être analysés. Nous avons ainsi proposé une nouvelle solution pour effectuer la démodulation à haute fréquence indépendamment de la fréquence d'acquisition limitée de la caméra. En introduisant un élément optique tel qu'un miroir sur un support piézo-électrique ou galvanométrique ou une cellule pockels devant la caméra, il est possible d'échantillonner temporellement le signal de fluorescence en distribuant spatialement 4 échantillons de l'intensité modulée à l'intérieur d'une même image acquise par la caméra. Ainsi le signal de la même molécule fluorescente est divisé

en 4 PSFs ayant 4 intensités différentes selon sa position initiale dans le motif d'excitation. Ces 4 PSF peuvent être réparties soit dans 4 cadrans distincts soit en les positionnant suivant une forme choisie (cf. Fig.2 a). Les fréquences de modulation/démodulation peuvent ainsi atteindre typiquement le kHz, ce qui permet d'acquérir au minimum une cinquantaine de cycles de modulation par image caméra enregistrée, et ainsi pouvoir analyser l'ensemble des émetteurs fluorescents uniques quelle que soit leur vitesse de clignotement. ModLoc peut aussi bien améliorer la résolution transverse [6] qu'axiale [7]. On voit ainsi sur un exemple simple où la modulation a été appliquée suivant une seule direction (x), que la précision de localisation obtenue avec ModLoc est de $\sigma_{ModLoc} = 3.7 \text{ nm}$ comparée à l'axe y, qui a été observée en localisation classique avec ajustement du signal par une gaussienne $\sigma_{Gauss} = 8.9 \text{ nm}$ soit une ●●●

Figure 2. a) Exemple de dispositif expérimental pour une application des interférences suivant la direction XZ. Le laser est séparé en 2 voies afin de créer directement les interférences dans l'échantillon. Le modulateur électro-optique permet de les déplacer au kHz. Différents dispositifs de démodulation ont été développés pour obtenir les 4 valeurs d'intensité de fluorescence dans une même image de la caméra, soit *via* une cellule Pockels, soit par un miroir piézo-électrique. b) Exemple de gain en précision de localisation de 2.4, en appliquant ModLoc suivant une direction transverse (x, data en rouge) qui permet de directement comparer par rapport à la localisation gaussienne standard (y, data en gris). c) Mesure de précision réalisée sur des molécules uniques (AF647) à l'intérieur de cellules et qui confirme l'uniformité de précision attendue avec ModLoc aussi bien axiale (σ_z) que latérale (σ_x) sur plusieurs microns. (adaptée avec autorisation de [6-7])



flexible.

Laser Engine for Biophotonics and Neuroscience



Up to 7 wavelengths
405 nm - 785 nm

iChrome FLE

- 2-fiber switch / splitter
- All diode design for long lifetime
- COOL^{AC} automatic alignment

Plug & play installation!

learn more...



Distributed by **OPTON LASER INTERNATIONAL**



amélioration comme attendue d'un facteur 2.4 (cf Fig. 2b). Lors de l'application pour améliorer la résolution axiale, nous avons choisi d'appliquer des interférences tiltées suivant l'axe xz, en décalant un des 2 faisceaux dans le plan focal arrière de l'objectif, ce qui permet de conserver un seul objectif. L'information de position en z est ainsi obtenue en combinant l'information de position latérale x, et l'information de phase dans le réseau d'interférence (θ étant l'angle de tilt des interférences):

$$z = \frac{\Lambda\phi}{2\pi\sin(\theta)} - \frac{x}{\tan(\theta)} \quad (4)$$

Ce dispositif nous permet d'obtenir des précisions de typiquement 6.8 nm axialement et 3.4 nm latéralement. De plus nous avons pu montrer que ces précisions restent uniformes aussi bien à l'intérieur de la profondeur d'observation mais également pour différentes positions dans l'échantillon jusqu'à 7 μm (cf. Fig.2c). La figure 3 présente des observations en (d)-STORM de différentes protéines à l'intérieur des cellules et immunomarquées par un anticorps primaire et un anticorps secondaire (associé à un fluorophore émettant un grand nombre de photons (Alexa 647)). La figure 3a permet ainsi d'identifier l'organisation de la protéine TOM20 marquant la membrane des mitochondries dans une cellule COS7 isolée. Nous avons pu observer également des cellules à l'intérieur de matrice de collagène mimant des tumeurs, et malgré la forte diffusion (fig.3c) le réseau de microtubules formant une partie du cytosquelette cellulaire peut être résolu pour une cellule située à plus de 30 μm en profondeur (Fig. 3b,d).

CONCLUSION

Cette capacité d'observation à grande profondeur et avec une résolution uniforme ouvre de nouveaux champs d'application à la microscopie de localisation de molécules uniques, pour l'observation d'échantillons complexes ou en volume. Cette technique a jusqu'à présent été appliquée

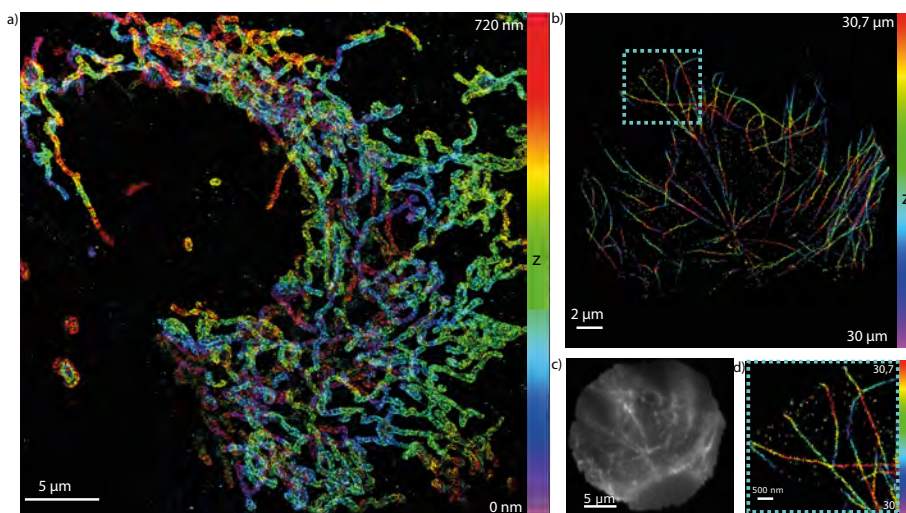


Figure 3.

- a) Image ModLoc des membranes de mitochondries de cellules COS7 (protéine marquée TOM20-Alexa 647), avec le z représenté en fausse couleur, pour une cellule à proximité de l'interface de la lamelle de microscope.
 b) Image ModLoc du réseau de microtubule dans une cellule COS7 placée à 30 μm en profondeur dans une matrice de collagène diffusante.
 c) Image de fluorescence classique de la même zone,
 d) zoom sur la région d'intérêt encadrée en b). (b-d adaptées avec autorisation de [7]).

suivant soit des directions transverses (x,y) soit une direction axiale, mais la combinaison de différentes modulations dans les 3 directions est également possible. Nous travaillons actuellement à repousser encore les limites de ModLoc, afin notamment d'améliorer encore la résolution. En effet jusqu'à présent le pas de l'interfrange d'excitation a été choisi pour s'ajuster à la profondeur

d'observation de l'objectif, un pas plus faible permettrait d'augmenter les performances mais nécessiterait de mettre en place un dépliement de l'information. Ce concept d'introduction d'une modulation temporelle pour révéler une information à l'échelle de la molécule unique est générique et pourrait s'appliquer à d'autres paramètres tels que par exemple l'orientation de la molécule. ●

RÉFÉRENCES

- [1] R.M. Dickson, A.B. Cubitt, R.Y. Tsien, W.E. Moerner, *Nature* **388**, 355-358 (1997)
- [2] E. Betzig, G. H. Patterson, R. Sougrat *et al.*, *Science* **313** (5793), 1642-1645 (2006)
- [3] A. von Diezmann, Y. Shechtman, W.E. Moerner, *Chem. Rev.* **117**, 7244(2017).
- [4] N. Bourg, C. Mayet, G. Dupuis *et al.*, *Nat. Photonics* **9**, 587-593 (2015)
- [5] L. Busoni, A. Dornier, J.-L. Viovy, J. Prost, G. Cappello, *J. Appl. Phys.* **98**, 064302 (2005).
- [6] P. Jouchet, C. Poüs, E. Fort, S. Lévêque-Fort, *Philos. Trans. R. Soc., A* **380**, 20200299 (2022).
- [7] P. Jouchet, C. Gabriel, N. Bourg *et al.*, *Fort E.*, et S. Lévêque-Fort, *Nat. Photonics* **15**, 297-304 (2021)



SUPER-RÉSOLUTION ET GÉOMÉTRIE CONFOCALE : ENTRE RÉOLUTION ET ACCESSIBILITÉ

La microscopie confocale est centrale en imagerie biologique en raison de son efficacité, de sa facilité d'utilisation et de sa versatilité. Elle permet d'obtenir rapidement des images avec une bonne résolution latérale (200nm environ) et en profondeur (0.2 - 0.5mm). Les microscopes confocaux sont simples à installer et assez abordables. Un utilisateur peut y être formé en quelques heures, et ils sont capables de travailler avec une grande variété d'échantillons et de fluorophores.

La résolution spatiale du microscope confocal est limitée par la diffraction lumineuse. Les techniques dites de « Super-résolution » permettent de repousser cette limite. Par exemple, la microscopie d'illumination structurée (SIM) utilise un éclairage structuré présentant des « zébrures » très fines, permettant d'atteindre une résolution d'environ 120 nm (jusqu'à 60nm sur les modèles les plus récents). Cette technique nécessite cependant des dispositifs d'illumination assez complexes et des échantillons très fins, elle a du mal à faire des images en profondeur.

En pratique, la microscopie super-résolue est souvent réservée aux plateformes d'imagerie, qui peuvent justifier l'achat de ces machines et y former leurs utilisateurs. Ces systèmes ne remplacent pas les microscopes confocaux, mais les complètent. Beaucoup de questions biologiques ne nécessitant pas la super-résolution, le confocal reste la première étape de la démarche d'imagerie. La super-résolution vient ensuite comme complément. Ainsi, il arrive souvent que l'utilisateur ne veuille pas d'une meilleure résolution spatiale au prix d'une complexité supplémentaire. Plutôt que d'une imagerie super-résolue, on veut une imagerie confocale super-résolue, présentant la même facilité et flexibilité que le confocal, mais avec une meilleure résolution. L'exemple le plus connu d'une

telle technique est l'AiryScan (Zeiss), qui atteint une résolution de 140nm.

L'illumination structurée s'accorde très bien avec la conception confocale. C'est ce que fait la microscopie de diffraction conique - le LiveCodim, développée par l'entreprise Franco-Tchèque Bioaxial, (Telight). Un système de mise en forme de faisceau crée à partir d'un laser classique des faisceaux de lumière contrôlée. Ces faisceaux ont une forme en « demi-lune » qui présente une extinction plus fine qu'une figure d'Airy classique, permettant d'extraire des fréquences spatiales supplémentaires des échantillons. On obtient une image mieux résolue d'une façon analogue au SIM, mais d'une manière localisée, atteignant des résolutions latérales entre 90nm et 120 nm.

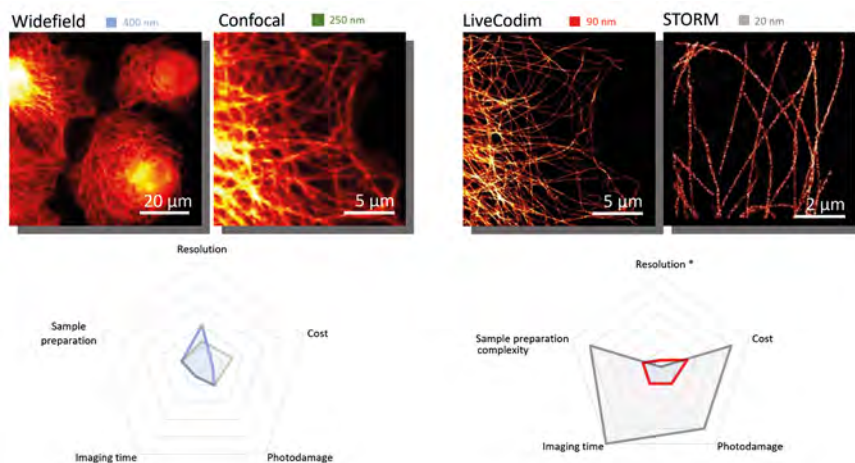
Le LiveCodim combine donc les avantages du confocal et de l'illumination structurée : il peut faire des acquisitions en trois dimensions (« Z-stack ») ou des images de tissus ou cellules en mouvement sans déformations. Le LiveCodim s'adapte à toutes sortes d'échantillons, ne nécessitant aucune préparation ou fluorophore particulier. Il fonctionne avec une large variété d'objectifs et de microscopes. Enfin, la technologie est

fondamentalement achromatique, ce qui lui permet de travailler avec n'importe quelle longueur d'onde, de 405 à 1200 nm. La réduction du budget photonique minimise les dommages causés aux échantillons. Cela est particulièrement utile lors de l'imagerie répétée de cellules ou de tissus vivants. Le système est un module connectable par un port Caméra sur n'importe quel microscope optique existant, permettant une conversion rapide d'un microscope à champ plein vers un système super-résolu.

Ce système s'insère ainsi pleinement dans la lignée des concepts à géométrie confocale qui mettent en avant la rapidité et la simplicité d'utilisation, améliorant la qualité d'image sans contraintes par rapport aux confocaux. Bien que leur résolution soit inférieure à d'autres systèmes plus coûteux et plus complexes, c'est l'accessibilité de ces « super-confocaux » qui fait leur essor actuel et leur importance pour le futur de l'imagerie optique. ●

Contact Bioaxial, Part of Telight & Telight en France :

Sylvain Martin, 06 72 34 61 79
sylvain.martin@optonlaser.com



* Lower means better capacity to distinguish fluorophores