

Microscopie optique haute résolution

Vincent Croquette

16 février 2010

Diffraction limited resolution

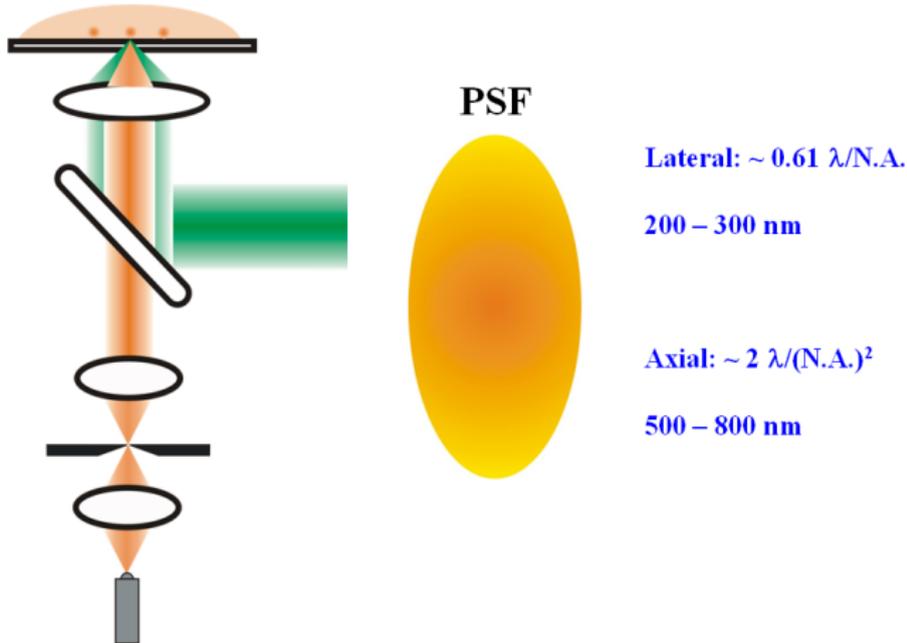


Figure: Lié à la nature ondulatoire de la lumière. Définie par la loi de Abbe .

Microscopie de fluorescence

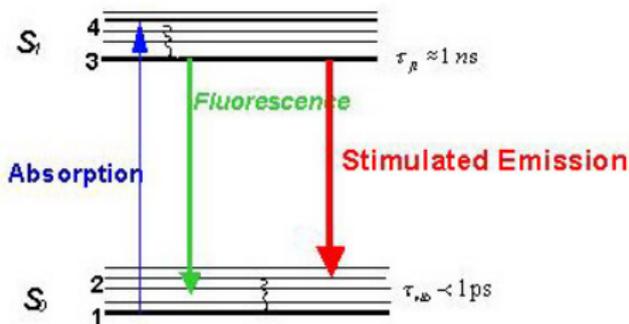
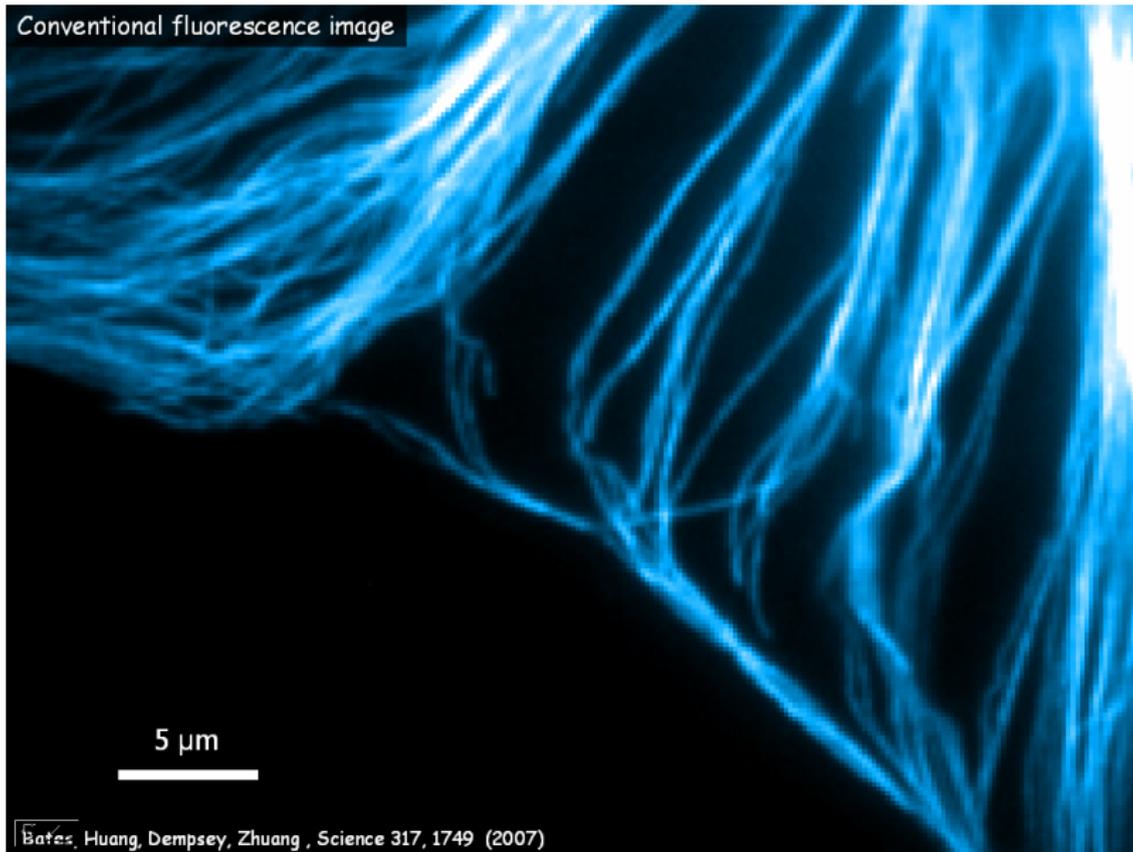


Figure: Pour pouvoir observer une molécule unique, il faut utiliser la fluorescence. Une molécule est excitée par une lumière bleue et absorbe un photon, elle perd rapidement son énergie de vibration et émet un photon vert (d'énergie plus faible) quelques nanosecondes après. L'émission du photon vert peut être stimulée ou spontanée.

Certaines molécules ne sont pas fluorescentes mais le deviennent après avoir changé de configuration sous l'influence de la lumière ultraviolette. Ces molécules sont dites commutables.

Image fluorescente d'un réseau de filament d'actine



On peut localiser une molécule unique à quelques nm

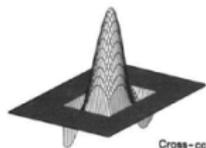
Single molecule detection

Moerner & Kador, PRL (1989)

Orrit & Bernard, PRL (1990)

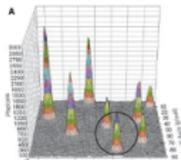
Localizing a single particle/molecule

Single particle



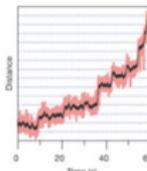
Gelles et al.,
Nature (1988)

Single molecule



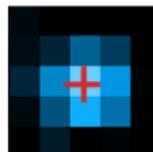
Yildiz et al.,
Science (2003)

Optical tweezers



Abbondanzieri et al.,
Nature (2005)

$$\sigma \approx \sigma_{\text{PSF}} / N^{1/2}$$



Thompson et al.,
Biophys J (2002)

Resolving of a few fluorophores

Dye photobleaching or QD blinking

Gordon et al., PNAS (2004)

Qu et al., PNAS (2004)

Lydke et al., Opt. Exp. (2005)



Spectral separation

Van Oijen et al., JOSA (1997)

Lacoste et al, PNAS (2000)

Churchman et al, PNAS (2005)

Toprak et al, Annu. Rev. Biophys. (2007)

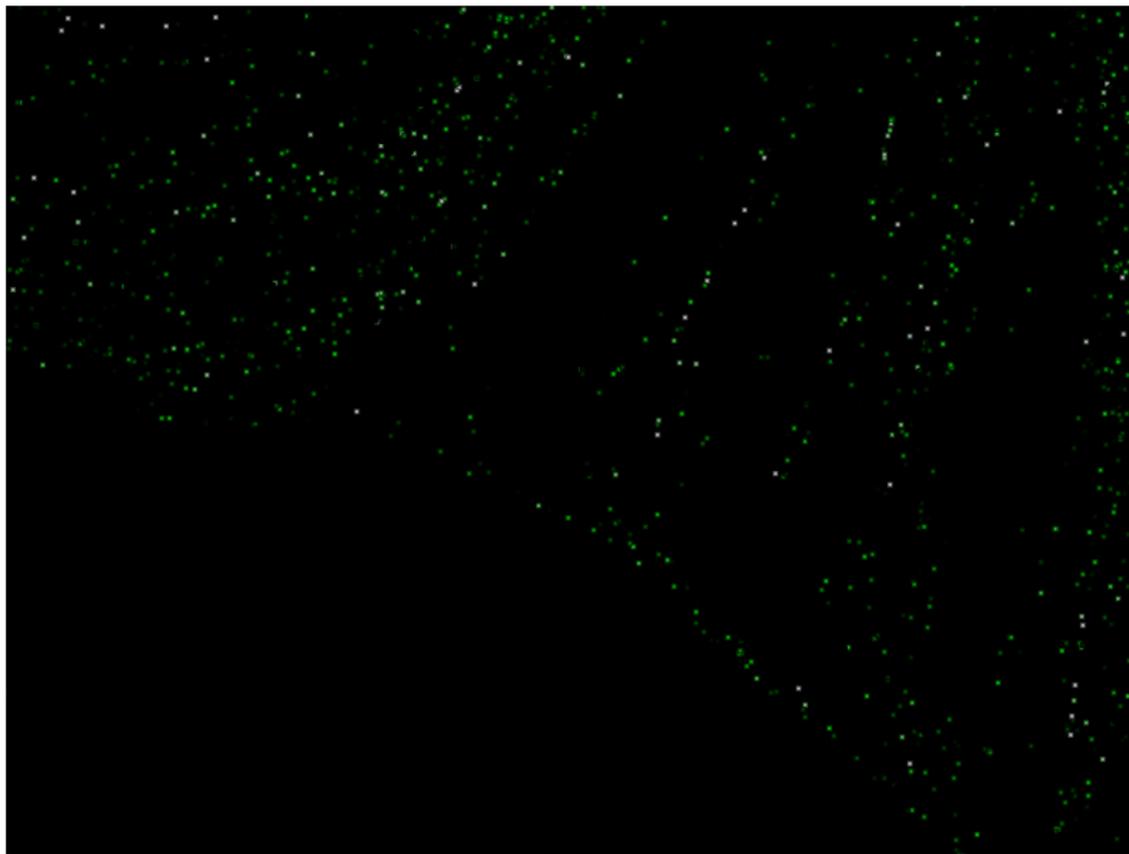
Principe de la microscopie STORM et PALM

Si nous pouvons observer quelques molécules individuelles, nous pouvons trouver leur position avec une précision de quelques nanomètres en enregistrant tous les photons qu'elles émettent avant d'être détruites par la lumière.

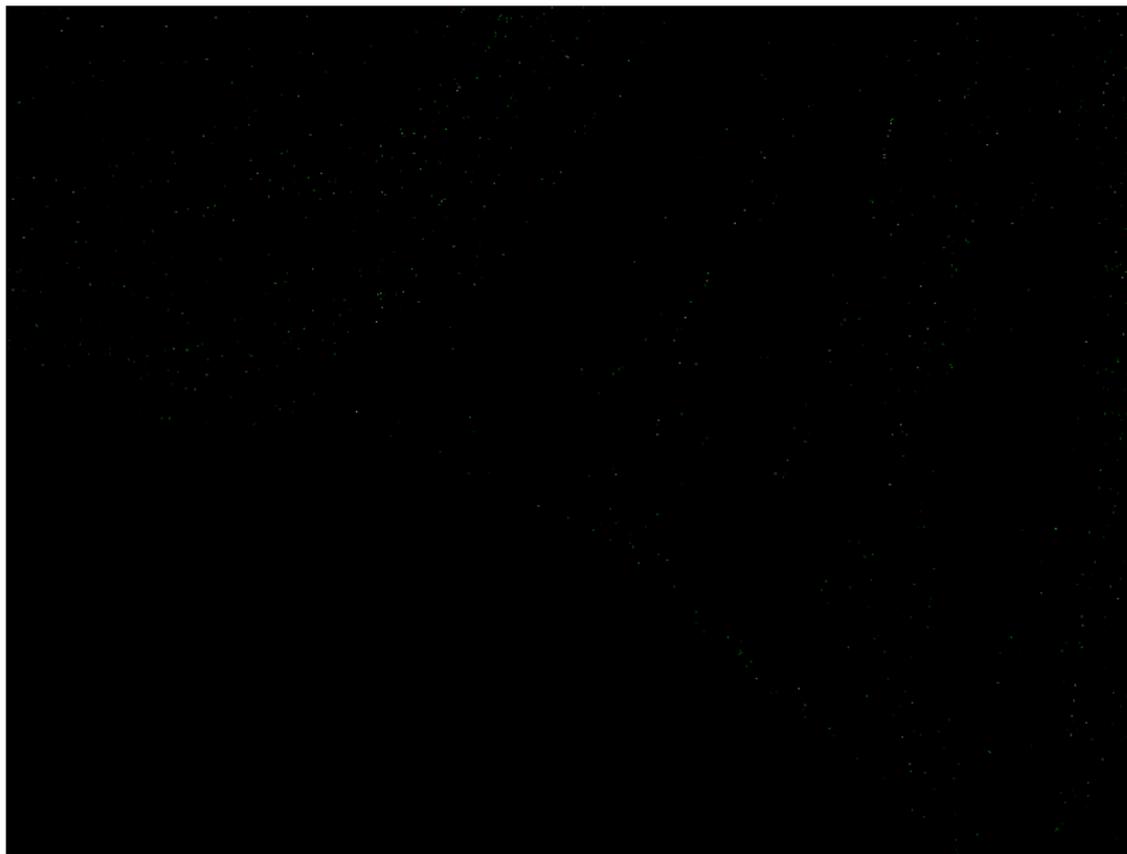
Pour faire une image haute résolution il suffit :

- ▶ D'observer des molécules fluorescentes commutables par un flash de lumière UV.
- ▶ De faire un petit flash UV qui bascule juste un petit nombre de molécules dans l'état fluorescent.
- ▶ Puis d'observer ces molécules fluorescentes en les éclairant dans le bleu jusqu'à leur disparition.
- ▶ De calculer le centroïde associé à chaque molécule et de le porter comme un pixel de l'image haute résolution.
- ▶ De répéter ce processus un grand nombre de fois en ajoutant les pixels ainsi obtenus.

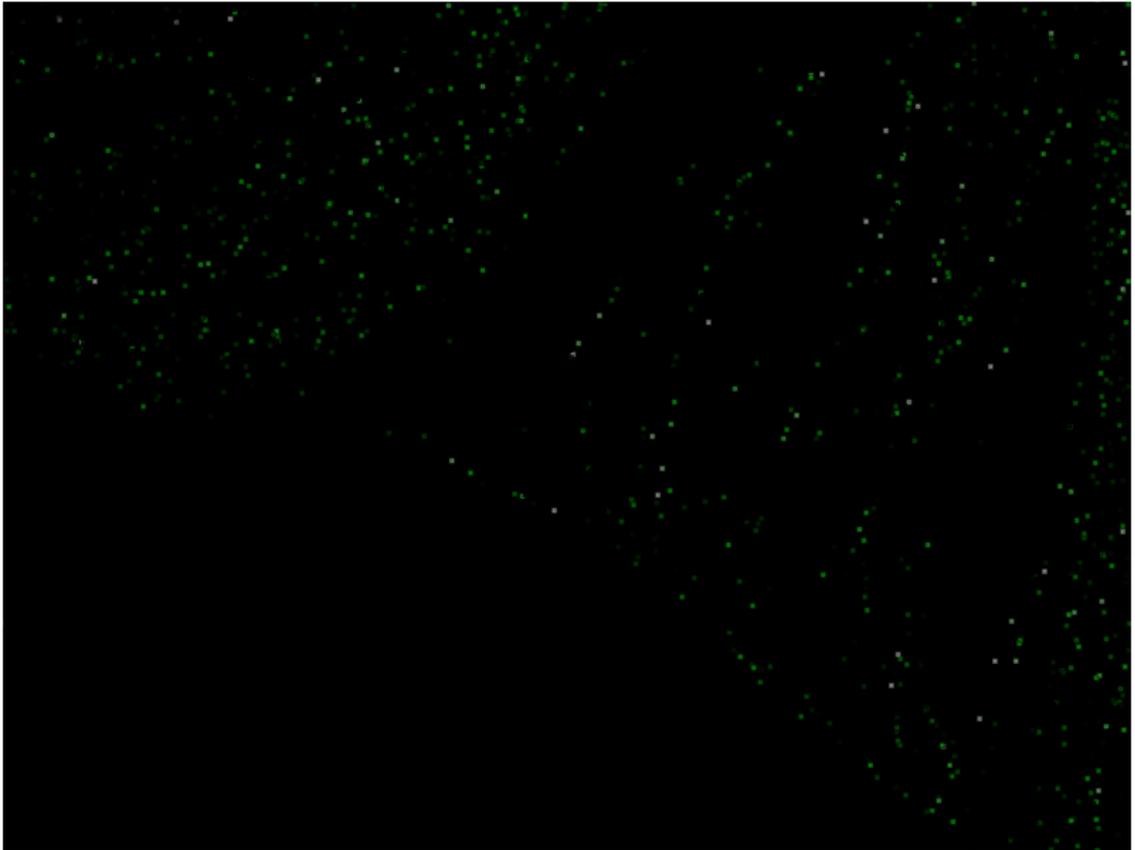
Première exposition : observation de quelques molécules



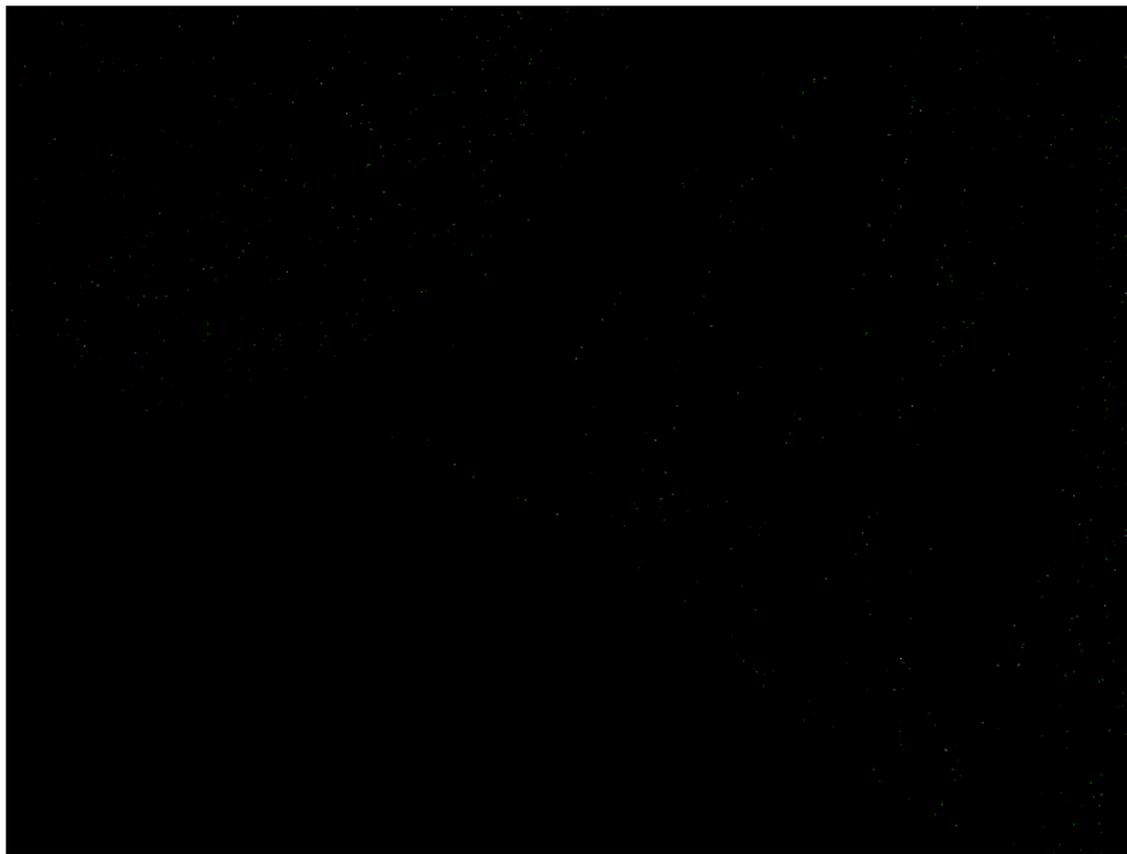
Première exposition : pointé des centroïdes



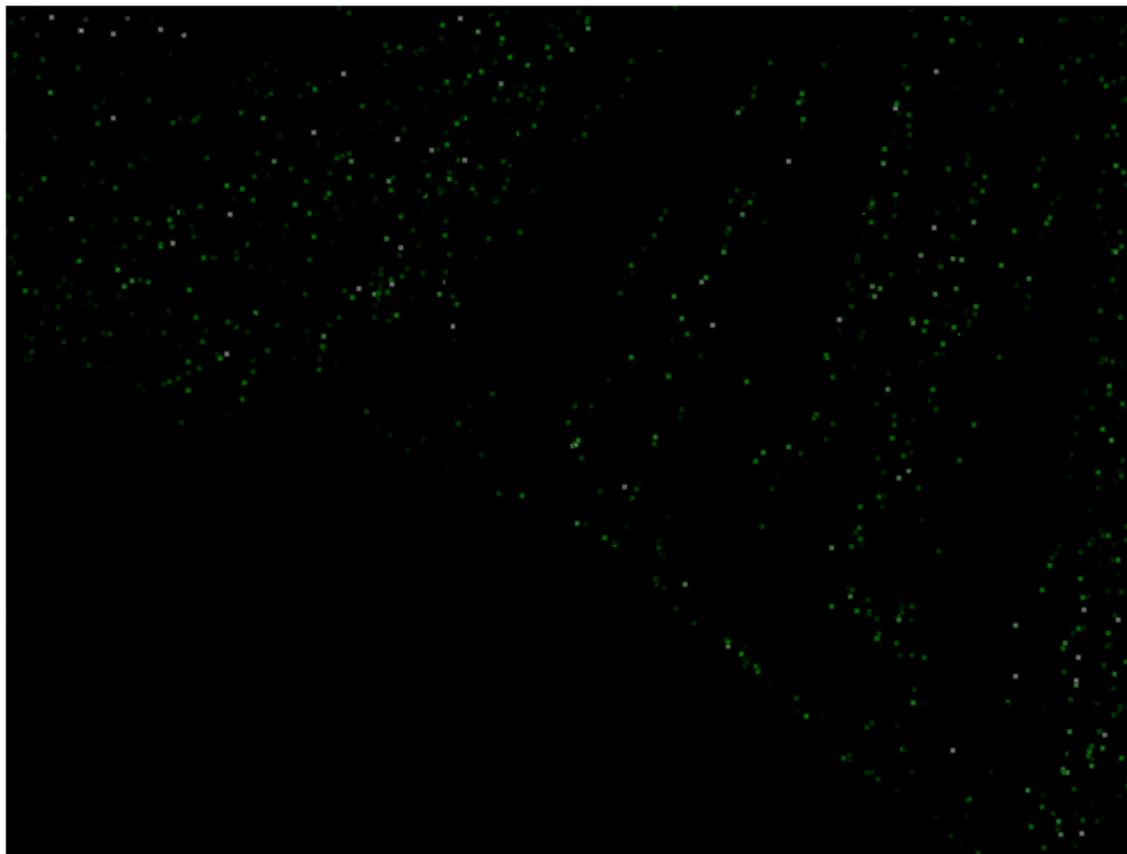
Deuxième exposition : observation de quelques molécules



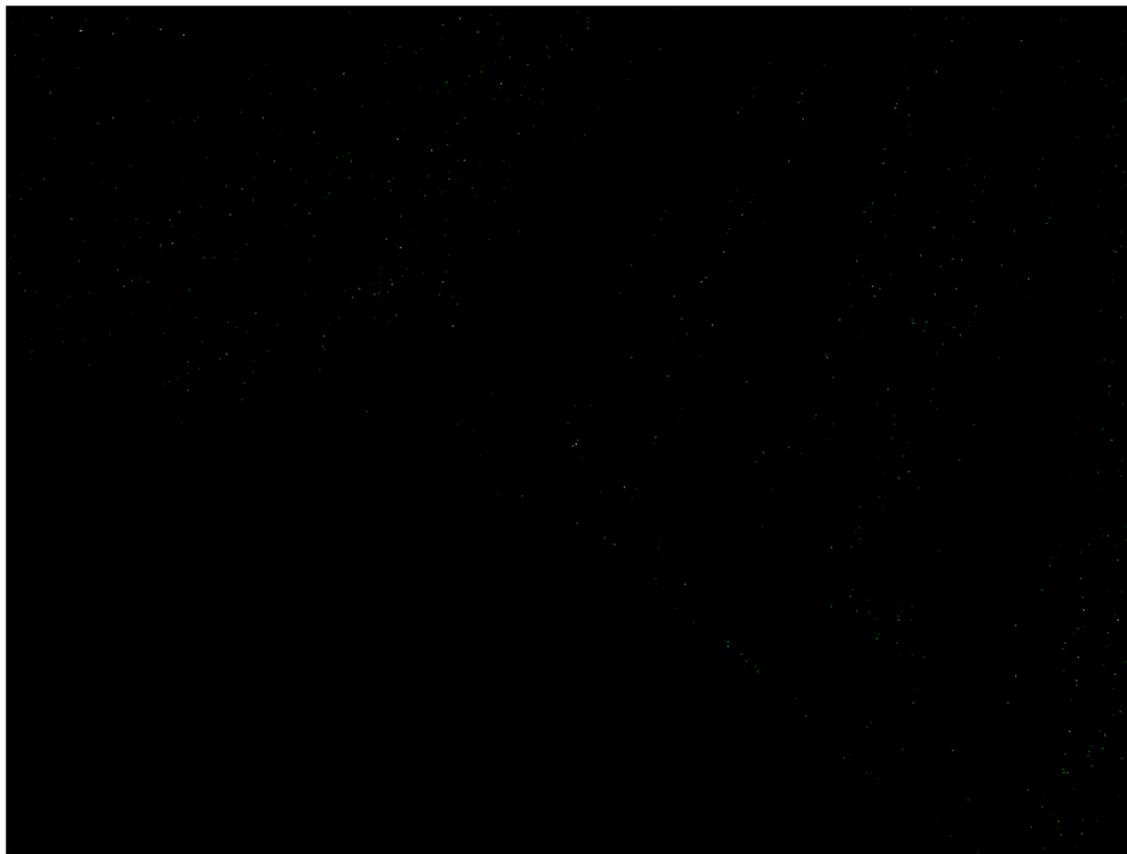
Deuxième exposition : pointé des centroïdes



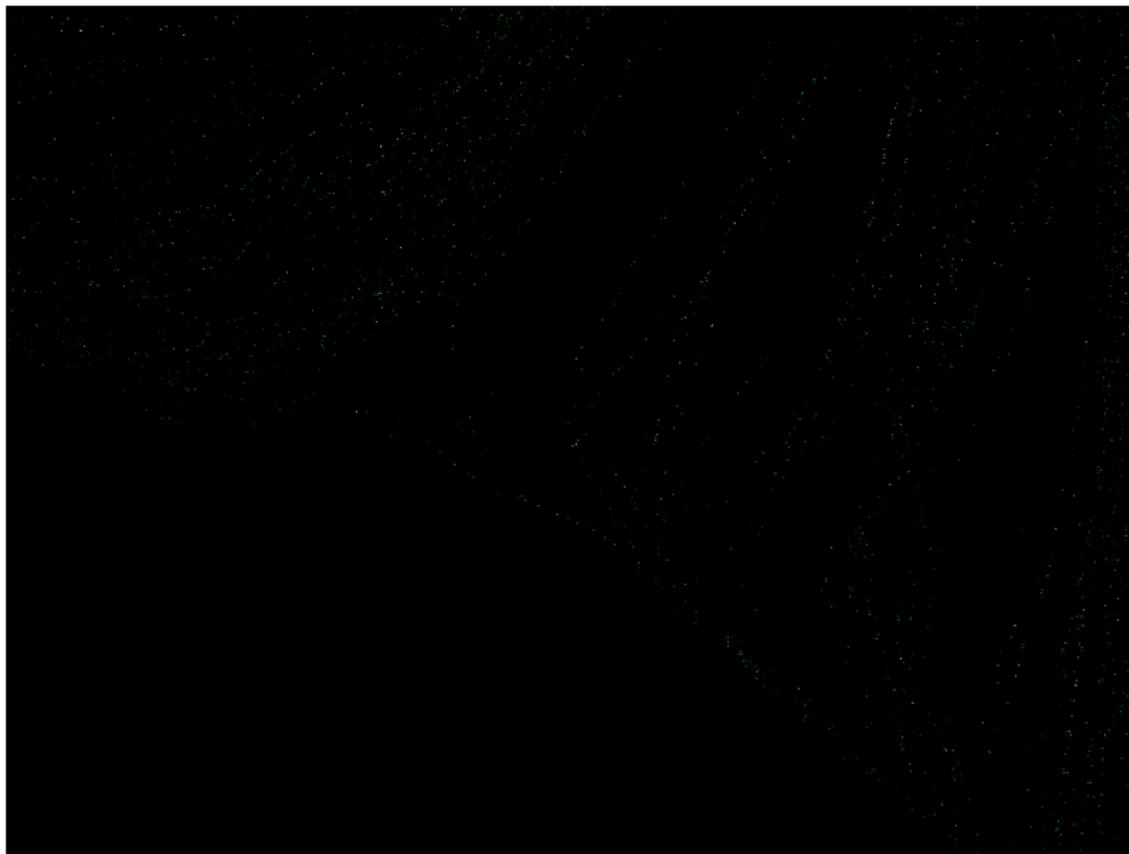
Troisième exposition : observation de quelques molécules



Troisième exposition : pointé des centroïdes



Addition des trois cycles



Après N cycles : Image STORM du même réseau de filament d'actine

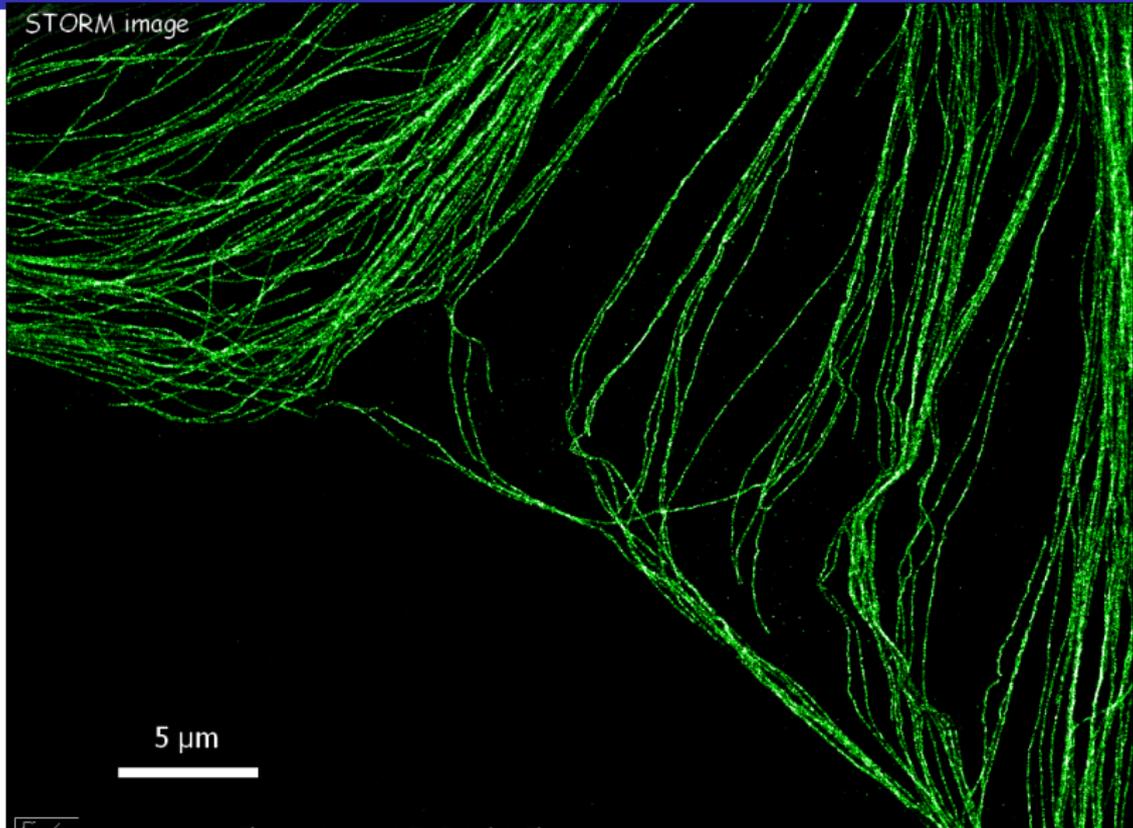


Image STORM avec des détails

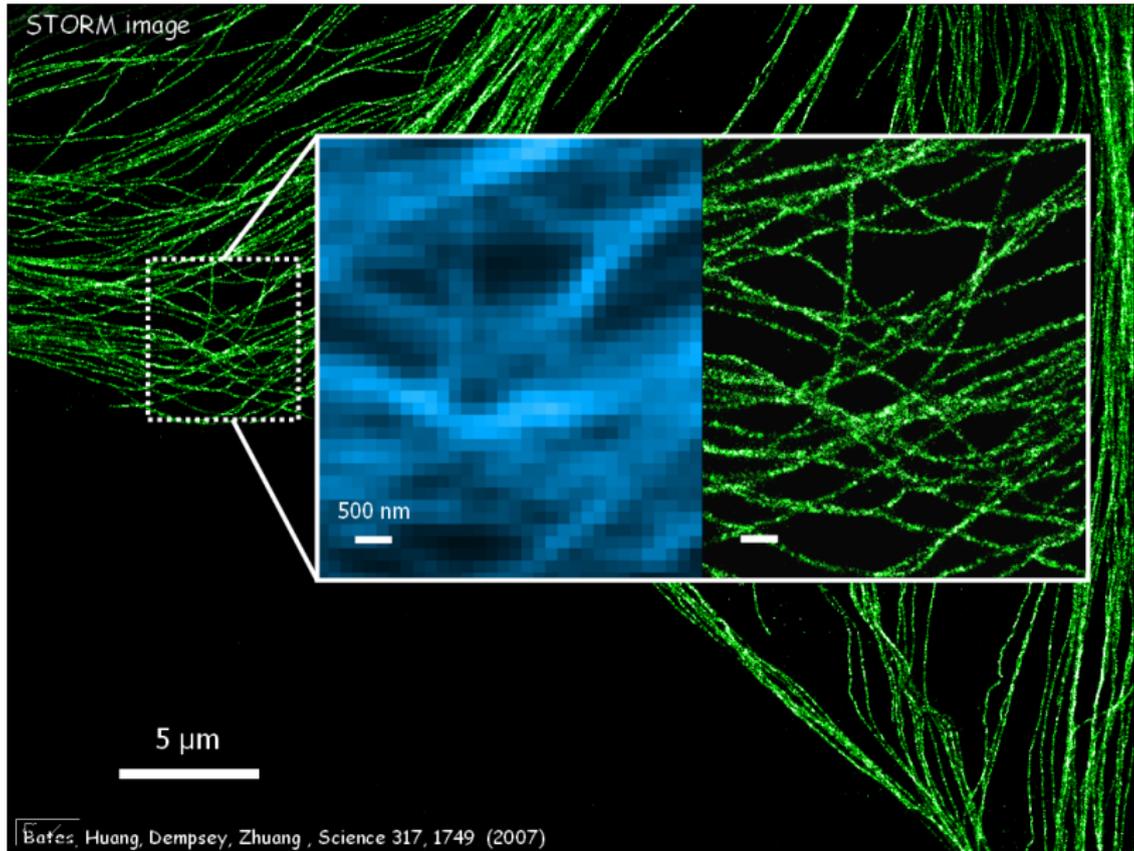


Image fluorescente Clatherine/microtubules

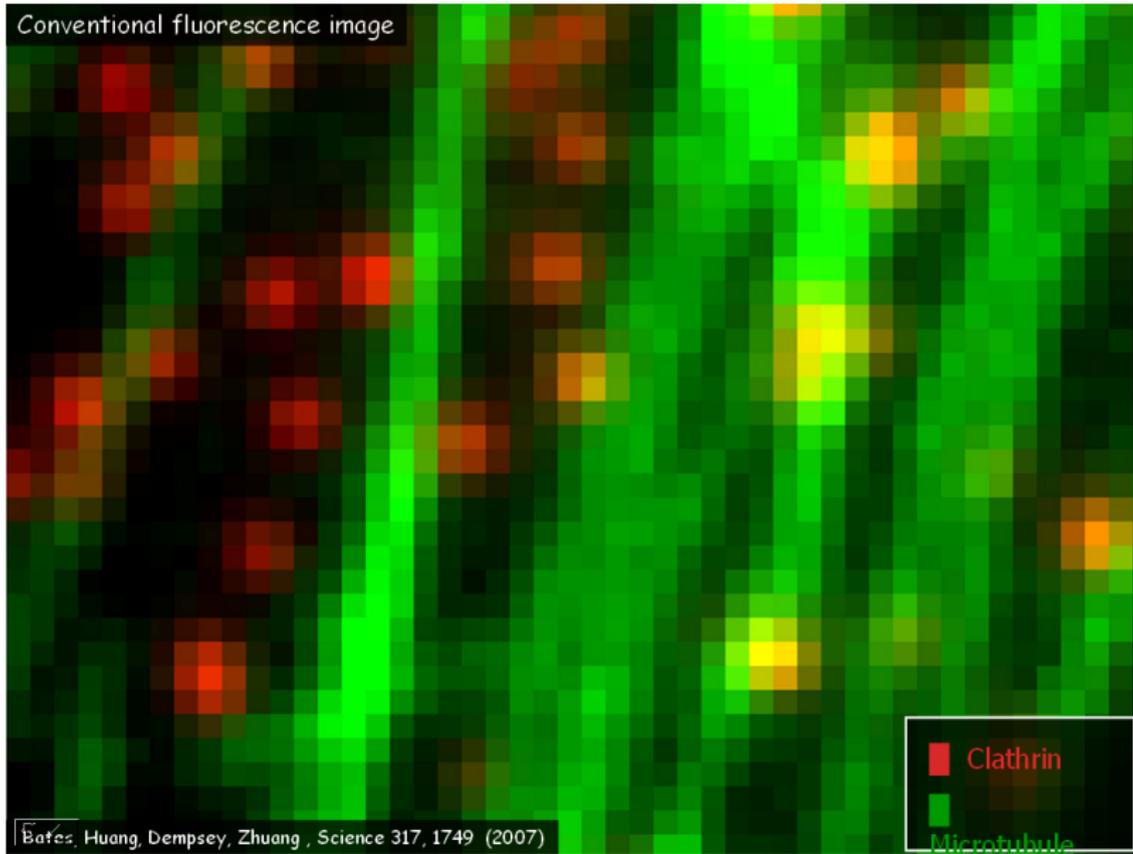
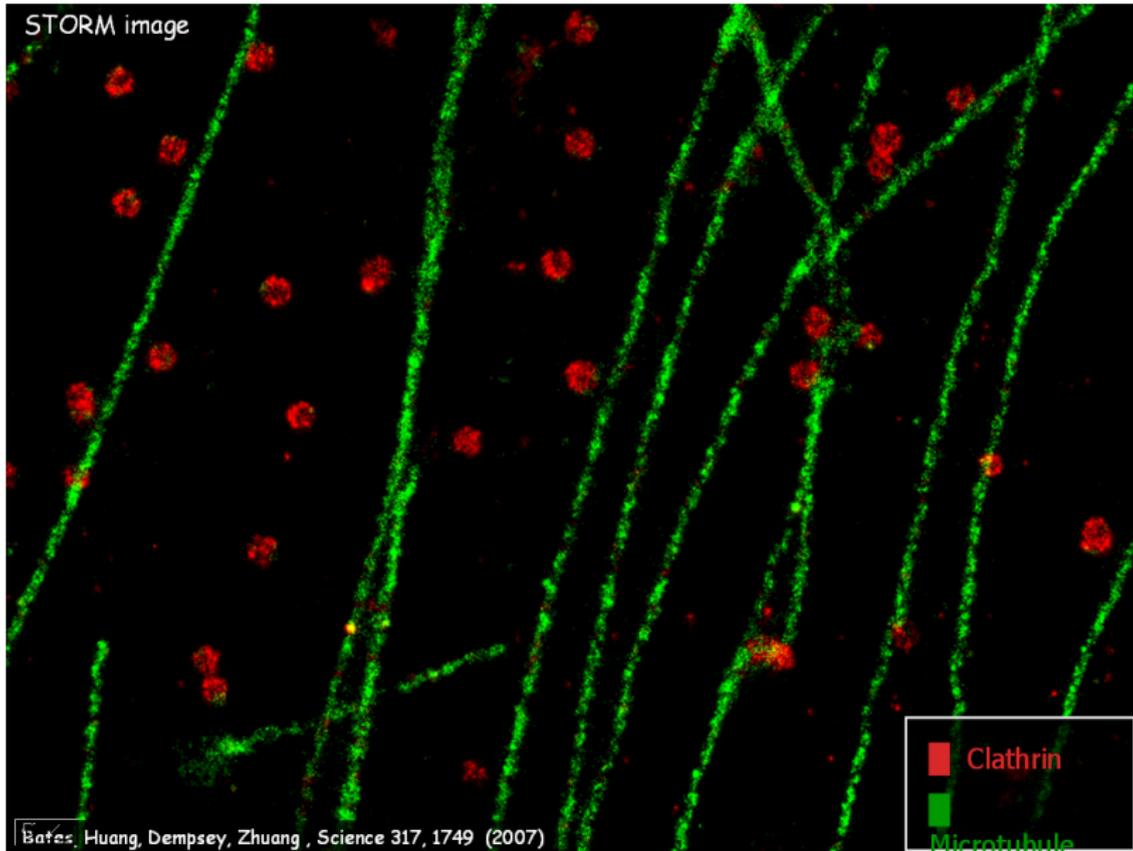
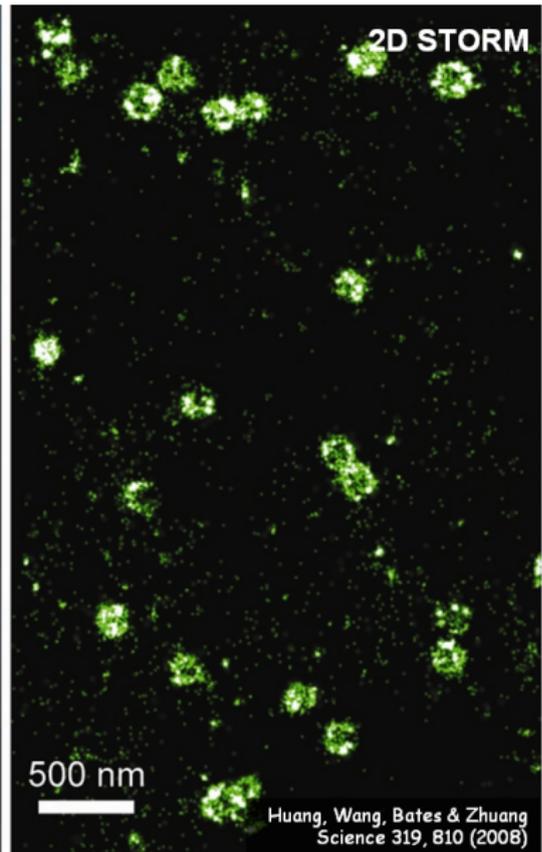
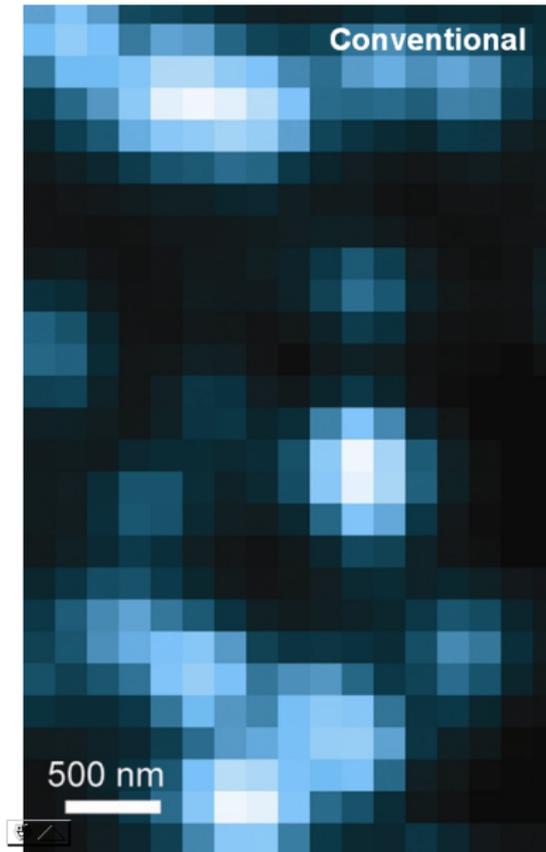


Image STORM Clathrine/microtubules



Comparaison image fluorescence normale et STORM

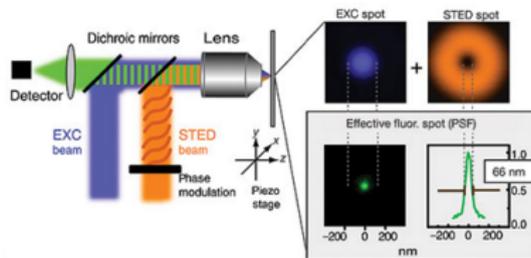


Avantages et limitations du STORM et PALM

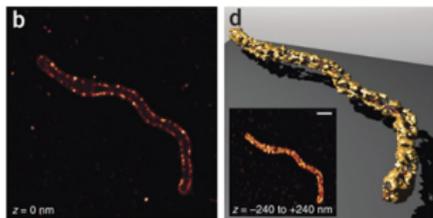
- ▶ Très simple à mettre en oeuvre.
- ▶ Résolution de 50 à 20 nm, souvent limitée par les dérives du microscope.
- ▶ Il faut que l'échantillon soit immobile pendant toutes les acquisitions !
- ▶ Grand nombre d'expositions, temps de prise de vue assez long (quelques minutes).
- ▶ Produit une image pointilliste uniquement pour des molécules fluorescentes.

Super-resolution imaging (by spatial patterning of excitation)

Stimulated emission depletion microscopy (STED, RESOLFT)



Hell et al, Opt Lett 17, 780 (1994)



40 - 45 nm resolution in 3D



Schmidt et al. Nat Meth 5, 539 (2008)

Spot lumineux très fin

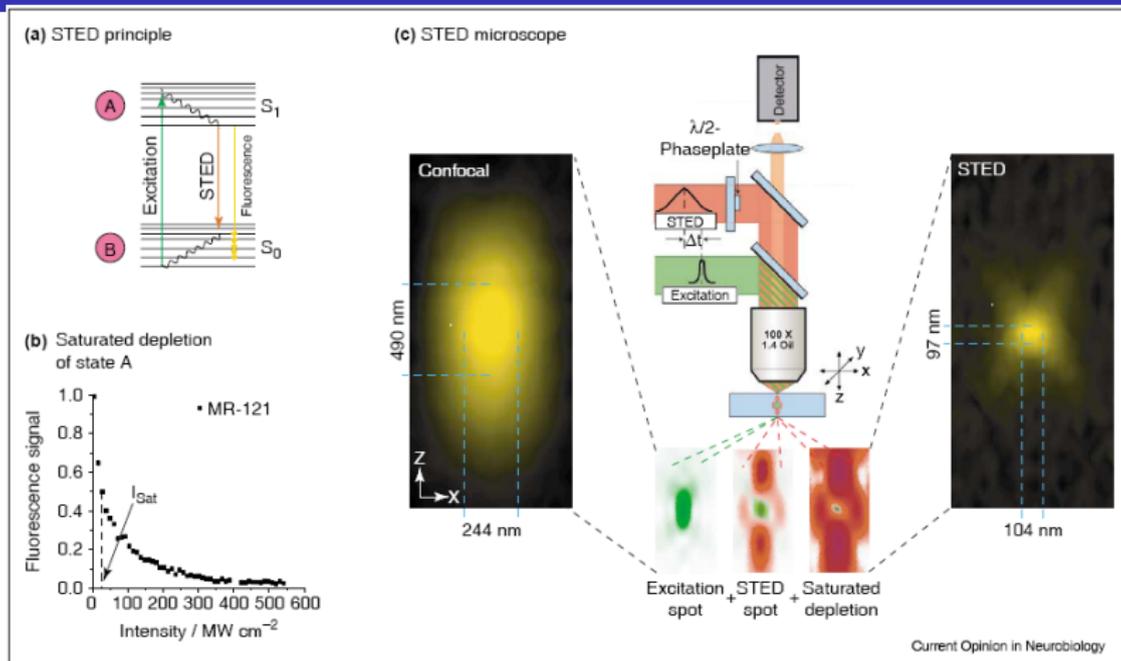


Figure: Le principe de la haute résolution du STED est de fabriquer un spot lumineux de fluorescence très fin (20 à 50 nm) et de balayer ce spot sur l'objet à visualiser. Pour faire se spot, on a besoin de deux lasers envoyant chacun une impulsion décalée l'une de l'autre de moins d'une nS .

Principe du STED

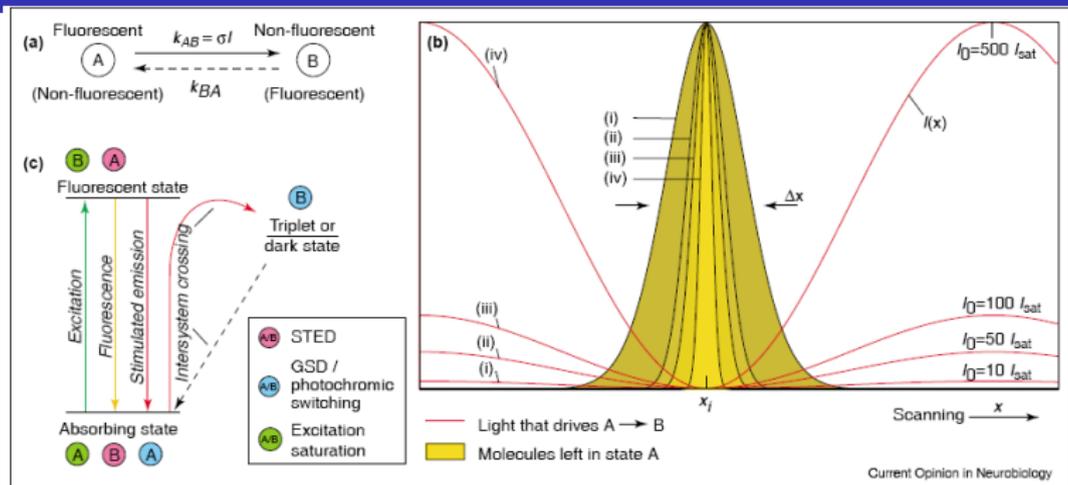


Figure: La première impulsion est focalisée par un objectif de microscope et excite les molécules fluorescentes sur une zone limitée par la diffraction (250 nm). La seconde est légèrement décalée vers les basses fréquences et utilise un mode spatial présentant un zéro au centre du spot. Elle désexcite les molécules fluorescentes par émission stimulée et annule en quelque sorte la première impulsion sauf juste au centre où cette impulsion est nulle. Au finale il reste un spot très fin de molécules fluorescentes.

Comparaison de différents types de microscopie

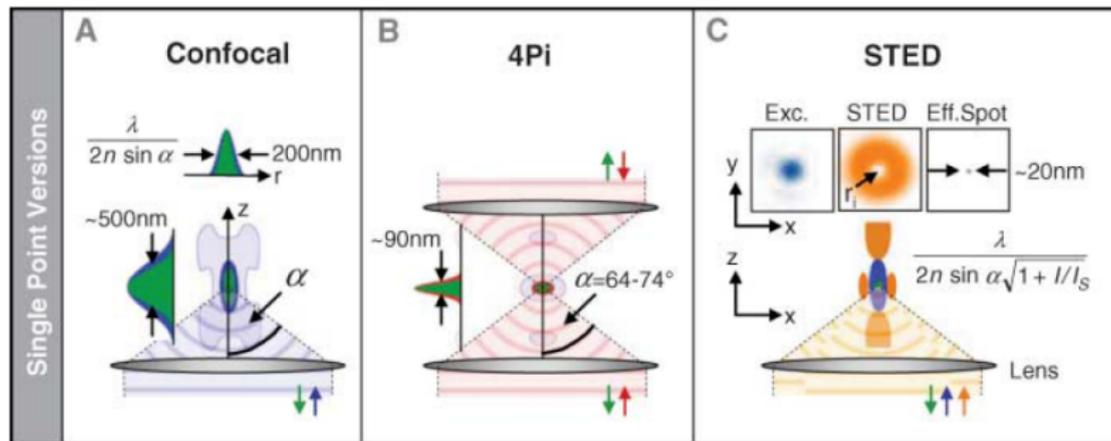
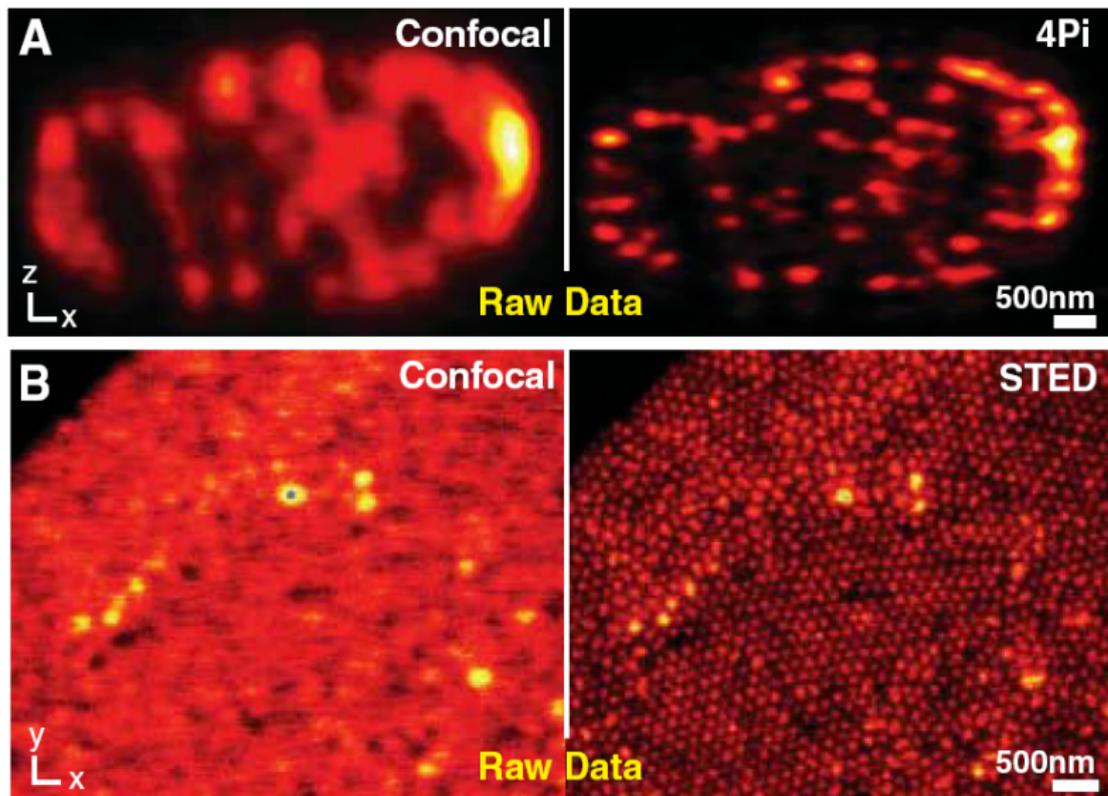
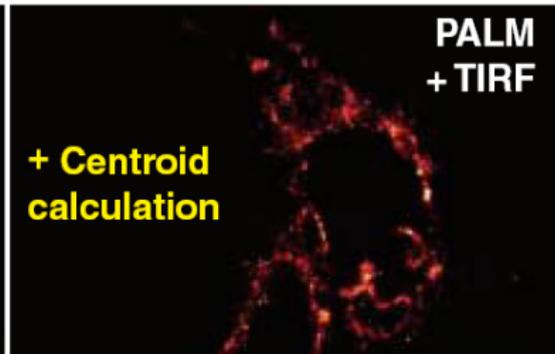
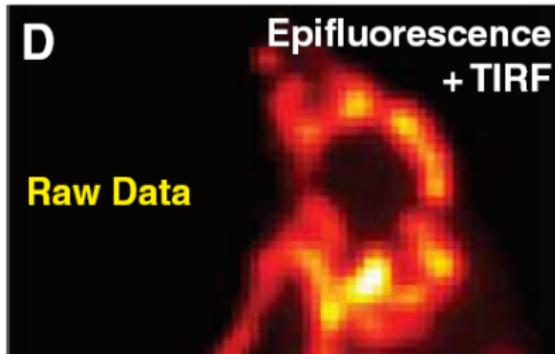
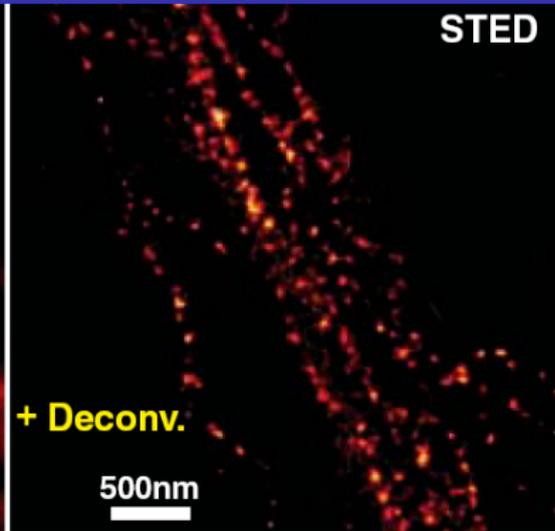
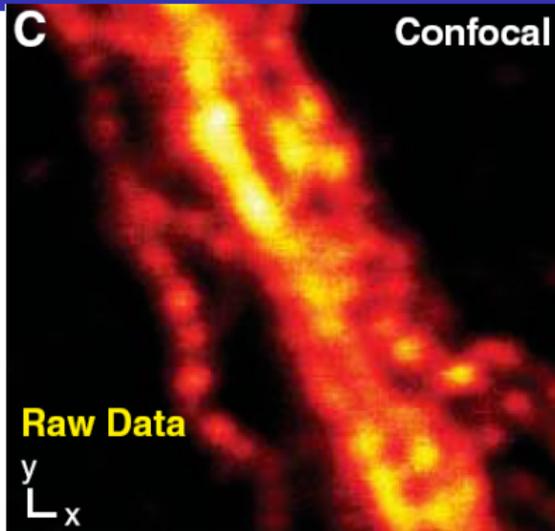


Figure: La résolution du microscope confocale est définie par la loi de Abbe $\lambda/(2n \sin \alpha)$ (où α est l'angle d'ouverture du microscope). Soit typiquement 200 nm en x, y . Elle est beaucoup moins bonne en z car l'objectif n'observe que d'un seul côté. Si on adopte un microscope utilisant deux objectifs regardant le même point on diminue le spot à 90 nm en z . Le STED permet d'augmenter considérablement la résolution en x, y .

Comparaison



Comparaison



- ▶ Demande la réalisation de pulses laser de deux couleurs différentes séparés de moins de 1ns.
- ▶ Résolution pouvant atteindre 20 nm.
- ▶ L'image est obtenue par balayage, un point à la fois (relativement lent).
- ▶ Gamme de fluorophore étendue.

Extension du STED

