



HAL
open science

Techniques d'amélioration de la résolution en microscopie de fluorescence : de la production des photons au traitement des images

Olivier Haeberlé, Bruno Colicchio

► **To cite this version:**

Olivier Haeberlé, Bruno Colicchio. Techniques d'amélioration de la résolution en microscopie de fluorescence : de la production des photons au traitement des images. *Spectra Analyse*, 2005, 34 (244), pp.22-26. hal-00921271

HAL Id: hal-00921271

<https://hal.science/hal-00921271>

Submitted on 15 Mar 2022

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



Distributed under a Creative Commons Attribution - NonCommercial 4.0 International License

Techniques d'amélioration de la résolution en microscopie de fluorescence : de la production des photons au traitement des images

Olivier Haeberlé, Bruno Colicchio

Groupe LabEl - Laboratoire MIPS - Université de Haute-Alsace IUT Mulhouse - 61 rue A. Camus - F-68093 Mulhouse Cedex
Tél : 03 89 33 76 60 - Fax : 03 89 33 76 05 - E-Mail : olivier.haeberle@uha.fr

RÉSUMÉ

Le microscope de fluorescence est devenu un instrument de référence pour la biologie. Ses capacités d'imagerie en trois dimensions sur des spécimens vivants sont en effet uniques. Cependant, comparée à d'autres techniques, la résolution des microscopes confocaux est encore limitée : de l'ordre de 150 nm latéralement, mais surtout pas mieux qu'environ 350 nm longitudinalement. Ceci limite grandement l'étude des structures fines intracellulaires. Nous présentons certaines techniques pour améliorer la résolution en microscopie optique en champ lointain.

MOTS CLÉS

Microscopie de fluorescence confocale 3D, Résolution

Techniques to improve the resolution in fluorescence microscopy : from photon production to image processing

SUMMARY

The fluorescence microscope is the instrument of choice for biology, because of its unique possibilities of acquiring data in 3-D within a living specimen. However, compared to other techniques, its resolution is still limited to about 150 nm laterally, and no better than about 350 nm longitudinally. This limits the study of small intracellular structures. We present some techniques to improve the resolution in far field fluorescence microscopy.

KEYWORDS

3-D confocal fluorescence microscopy, Resolution

I - Introduction

L'acquisition d'une image multidimensionnelle en microscopie optique requiert la maîtrise de nombreuses techniques, photonique (lasers), optique (microscope), électronique (détection) et informatique (traitement des données). Une approche système permet cependant d'identifier trois étapes (*figure 1*). On peut en effet séparer dans la chaîne d'acquisition d'une image, tout d'abord les

phénomènes physiques de production du signal lumineux, le système de mesure et les post-traitements numériques permettant de reconstruire les images.

II - Processus d'émission photonique

La maîtrise du processus d'émission photonique consiste à essayer de provoquer l'émission du si-



Figure 1
Décomposition en blocs du processus d'amélioration des images en microscopie optique.

gnal de fluorescence de manière contrôlée dans une zone la plus petite possible. On montre en effet que dans un microscope à balayage, la limite de résolution est imposée par le plus petit volume dans lequel on crée le signal et non par le système de détection.

La première amélioration de la résolution par cette approche a donné naissance au microscope confocal, qui consiste à utiliser le même objectif pour à la fois exciter et observer le spécimen (1). La figure 2 décrit le principe des microscopes classique et confocal. L'utilisation d'un laser permet de n'exciter le spécimen que dans un petit volume autour du point focal, contrairement à un microscope classique, où le spécimen est éclairé uniformément. Un « pinhole » devant le détecteur permet de rejeter la lumière venant d'autres points que le point focal. On peut aussi mettre à profit le phénomène d'interférence pour réduire la zone d'observation effective. Dans cette technique, appelée microscopie 4Pi (4), l'échantillon est illuminé de manière cohérente à travers 2 objectifs et le signal de fluorescence est détecté par un système confocal (Microscopie 4Pi de type A). Le signal de fluorescence peut aussi être détecté par ces deux objectifs et recombinaison (Microscopie 4Pi de type B). Lorsque excitation et détection sont effectuées de manière cohérente, on obtient un microscope 4Pi de type C (figure 3).

Pour un objectif d'ouverture numérique 1.4 et à une longueur d'onde de détection de 450 nm, on obtient une résolution latérale de 200 nm et longitudinale de 450 nm pour un microscope classique. Pour un microscope confocal, en considérant une excitation à 400 nm, on obtient une résolution latérale de 130 nm et longitudinale de 320 nm. Avec les mêmes paramètres et pour un microscope 4Pi type C, la résolution longitudinale est 70 nm, la résolution latérale restant celle d'un confocal (figure 4, page suivante). La firme Leica propose maintenant un tel microscope (5).

Une autre approche possible utilise les propriétés des fluorophores. Lorsqu'un colorant est excité, la transition de fluorescence peut avoir lieu spontanément si on laisse la molécule relaxer librement, ou être induite par émission stimulée à l'aide d'un rayonnement externe (figure 5, page suivante). En microscopie STED (Stimulated Emission Depletion) (6), on utilise cet effet pour dépeupler le niveau excité, qui ne peut alors plus contribuer au rayonnement de fluorescence spontanée.

On excite donc d'abord une petite zone, à l'aide

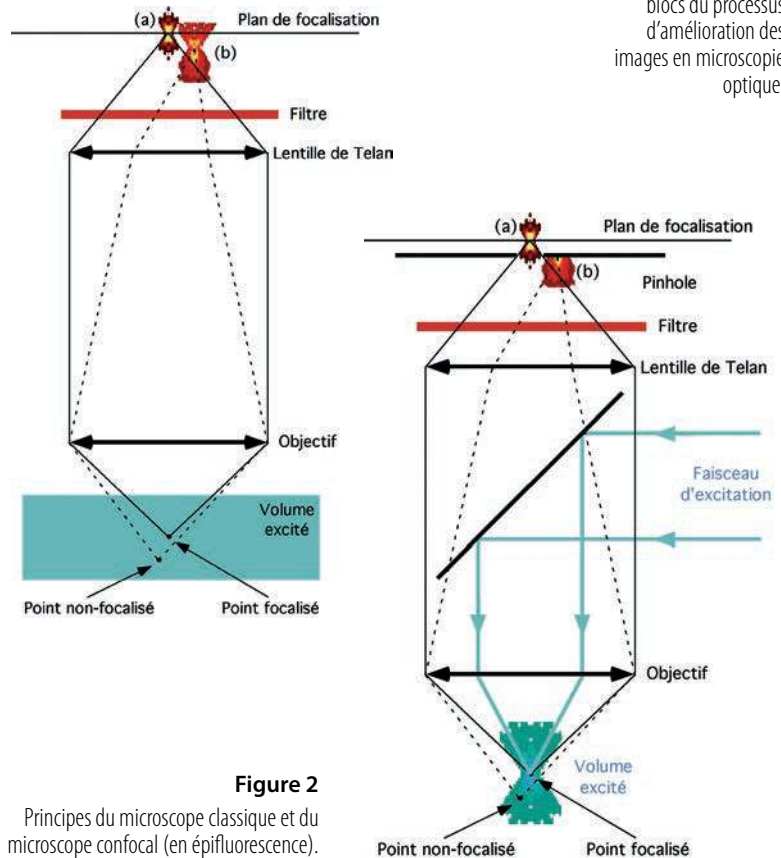
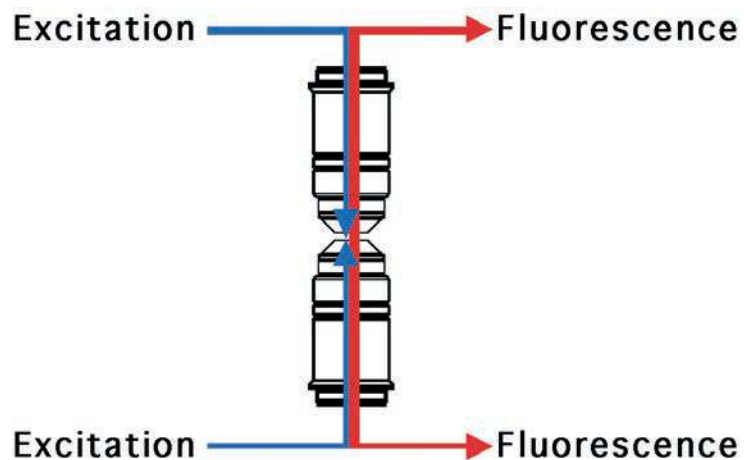


Figure 2
Principes du microscope classique et du microscope confocal (en épifluorescence).

Figure 3
Principe de la microscopie de fluorescence 4Pi de type C.



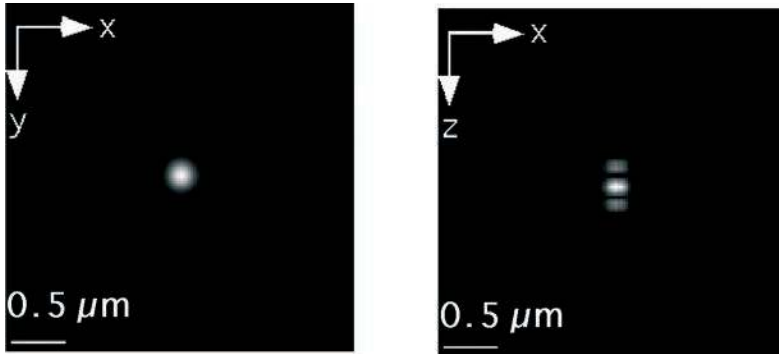


Figure 4
Réponse impulsionnelle optique d'un microscope de fluorescence 4Pi de type C pour un objectif d'ouverture numérique 1,4.

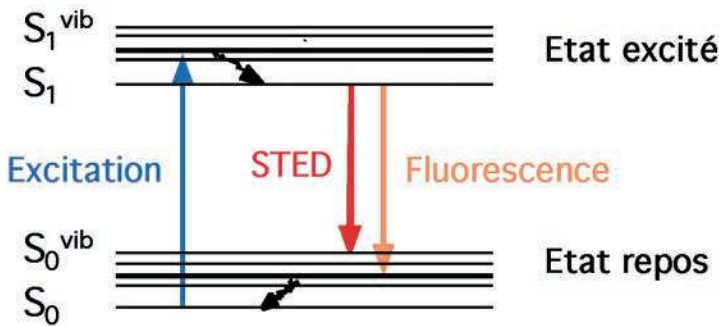


Figure 5
Diagramme de Jablonsky et principe du microscope STED

NOTE

Ce travail a été réalisé en concertation avec le programme Interreg III aidé par la communauté Européenne et la région Alsace, Programme Rhin Supérieur Centre Sud, Rhénaphotonics.

d'un faisceau focalisé (figure 6a). Dans un microscope confocal classique, cette zone excitée donne naissance à un signal de fluorescence spontanée, dont la forme est très similaire au spot d'excitation (figure 6b). Dans un microscope STED, le spot d'excitation est suivi très rapidement par un spot STED (figure 6c), qui provoque le phénomène de fluorescence induite sur les bords du spot d'excitation. Il faut donc mettre en forme à l'aide d'un montage optique le faisceau STED de telle manière qu'il présente l'aspect d'une « sphère creuse ». La fluorescence spontanée ne peut alors être émise que de la partie centrale du spot d'excitation, qui a été excitée, mais non dépeuplée. Il en résulte donc une réponse impulsionnelle optique finale bien plus petite (figure 6d).

Une résolution de 100 nm en trois dimensions sur des cellules vivantes a été atteinte (7). L'observation de molécules uniques fixées sur substrat avec une résolution inférieure à 30 nm a aussi été possible (8,9). En principe, la résolution de cet instrument n'est limitée que par le rapport signal sur bruit obtenu, la résistance des molécules à l'excitation et à la désexcitation STED, et la stabilité des états moléculaires impliqués (10).

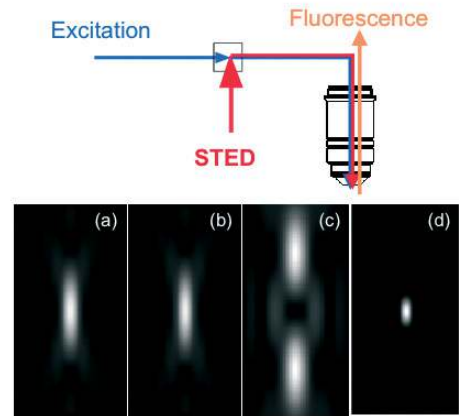


Figure 6
Réponses impulsionnelles optiques entrant en œuvre dans un microscope confocal STED. (a) : excitation, (b) : fluorescence normale, (c) : faisceau STED, (d) : PSF finale.

Pour l'instant, cette technique requiert cependant une instrumentation picoseconde et femtoseconde délicate et chère. Les fluorophores adaptés à cette microscopie ne sont pas nombreux. Des résultats prometteurs ont néanmoins déjà été obtenus en immunofluorescence (11), et l'ingénierie des molécules fluorescentes devrait permettre la création de fluorophores spécifiquement adaptés à cette nouvelle technique (12).

III - Modélisation du microscope

Les modèles de formation d'image permettent de comprendre comment le microscope déforme le signal émis par le spécimen. Nous avons développé une modélisation rigoureuse des microscopes de fluorescence (13-16).

En règle générale, les expressions donnant les réponses impulsionnelles optiques (RIO) en illumination et en détection ne sont pas identiques. L'utilisation des expressions rigoureuses en détection est indispensable si l'on désire étudier les phénomènes de polarisation en fluorescence ou si une grande différence existe entre les différents indices de réfraction, par exemple en cristallographie (14,16). On peut cependant dire que pour les applications biologiques, les RIO d'excitation et de détection sont très proches, ce qui justifie l'approximation classique consistant à dire que la RIO du microscope confocal est obtenue en élevant au carré celle du microscope classique.

Nos modèles permettent de calculer les RIO utilisées pour la déconvolution des données (voir point suivant), mais aussi de vérifier les conditions d'utilisation du microscope, un point important pour préciser les protocoles d'acquisition.

(17) et s'appliquent aussi aux nouvelles configurations optiques comme le microscope 4Pi ou le microscope STED. En effet, ces instruments nécessitent une parfaite superposition de deux faisceaux d'excitation (microscope 4Pi) ou d'un faisceau d'excitation et d'un faisceau d'émission stimulée (microscope STED). De ce fait, ils sont très sensibles aux aberrations induites par les différents milieux traversés.

IV - Déconvolution

Lorsque le meilleur de l'instrument a été obtenu, on peut encore améliorer les données obtenues par des techniques de déconvolution, utilisées pour simultanément améliorer la résolution des images, et les débruiter. Les mesures quantitatives sont alors de bien meilleure qualité. Un problème des algorithmes de déconvolution courants est qu'ils

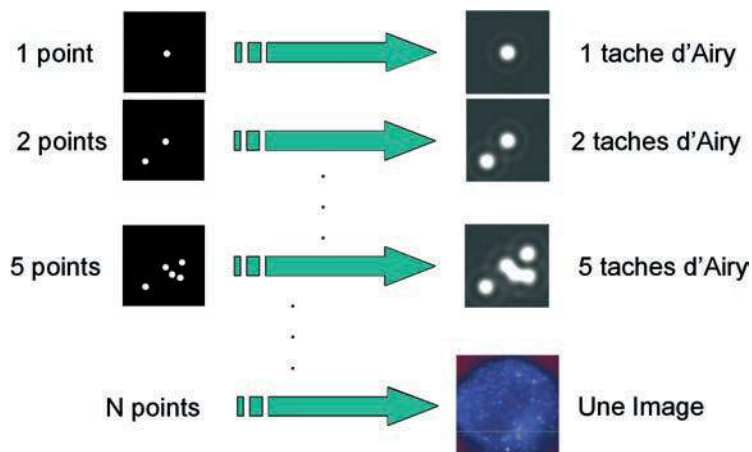


Figure 7
Modèle de formation d'image Monte-Carlo.

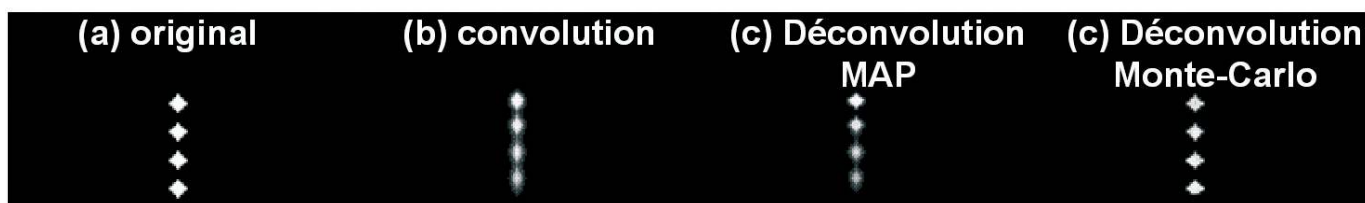


Figure 8
Déconvolution tenant compte de la variation spatiale de la RIO. (a) : objet original, (b) : convolution variant avec la profondeur, (c) : déconvolution classique, et (d) : déconvolution Monte-Carlo.

supposent la RIO invariante dans l'image. Cette hypothèse est en réalité souvent prise en défaut. Nous avons donc développé une méthode de déconvolution Monte-Carlo, permettant de tenir compte de cette non-invariance spatiale de la RIO (18). Cette méthode vise à reproduire de manière numérique le processus de formation des images, point par point dans le volume de données. A chaque point de l'objet est ainsi associé une RIO dans l'image finale (figure 7).

En déconvolution Monte-Carlo, on considère l'objet comme un ensemble de point, et l'image comme un ensemble de RIO. On essaye alors de reconstruire une image ressemblant le plus possible à l'image enregistrée. Ce faisant, on reconstruit simultanément l'objet donnant naissance à cette image. Contrairement aux algorithmes classiques, il est alors possible d'utiliser non pas une RIO, mais une famille de RIO, l'algorithme sélectionnant automatiquement celle qui est adaptée à la région du spécimen considéré.

La figure 8 montre les résultats obtenus en simulation pour une pile de billes de 0.5 μm de diamètre (microscope confocal, NA=1.4). La figure 8a présente l'objet de départ. La figure 8b montre l'image simulée, tenant compte d'une variation spatiale de la RIO avec la profondeur. La bille du fond est plus floue que la bille du haut, à cause de l'aberration sphérique induite par la différence d'indices de réfraction entre le milieu d'immersion (huile)

et le spécimen (eau). La figure 8c montre le résultat incorrect d'une déconvolution classique à l'aide de l'algorithme Maximum a Posteriori. La figure 8d montre le résultat d'une déconvolution Monte-Carlo tenant compte de la variation de la RIO avec la profondeur. Les intensités et les formes sont maintenant correctement restaurées.

On pourrait aussi tenir compte de variations induites par le spécimen lui-même (19). Les modèles de calcul de RIO actuels supposent que le spécimen est homogène. L'extension de ces modèles à des spécimens hétérogènes est en cours (20). Une cartographie des indices dans le spécimen (21) permettra alors une correction numérique des données.

V - Conclusion

L'étude des spécimens biologiques en microscopie optique nécessite de nouveaux développements visant à améliorer encore la résolution.

Trois axes sont activement explorés. La maîtrise des phénomènes d'émission photonique par ingénierie de la Réponse Impulsionnelle Optique permet de réduire le volume d'émission, et donc d'affiner les plus petits détails détectables. La compréhension des mécanismes de formation des images, en particulier dans les spécimens hétérogènes doit permettre de maintenir la qualité

des données acquises, par des solutions matérielles (optique adaptative) ou numériques (restauration des images). Enfin, lorsque le meilleur de l'instrument a été obtenu, on peut encore améliorer la résolution par déconvolution des données à l'aide de la RIO de l'instrument, qui

peut être mesurée ou calculée. La combinaison de ces diverses approches permet d'envisager avec réalisme le développement de techniques de nanoscopie en champ lointain, avec une résolution finale de quelques dizaines de nm en trois dimensions.

BIBLIOGRAPHIE

- (1) MINSKY M., Memoir on inventing the confocal microscope, Scanning, 1988, **10**, 128-138.
- (2) DENK W., STRICKLER J.H. AND WEBB W.W., Two-photon laser scanning fluorescence microscopy. Science, 1990, **248**, 73-75.
- (3) KÖNIG K., Multiphoton microscopy in life sciences, J. Microsc., 2000, **200**, 83-104.
- (4) HELL S.W. AND STELZER E.H.K, Fundamental improvement of resolution with a 4Pi-confocal fluorescence microscope using two-photon excitation, Opt. Comm. **93**, 1992, 277-282.
- (5) STORZ R., GUGEL H. AND RYGIEL R., "Compact and fast 4Pi beam scanning microscope for imaging fixed and live cells", Focus on Microscopy 2004, April 4-7, 2004, Philadelphia - USA.
- (6) HELL S.W. and Wichmann J., Breaking the diffraction resolution limit by stimulated emission: stimulated-emission-depletion fluorescence microscopy. Opt. Lett. 1994, **19**, 780-782.
- (7) KLART.A., JAKOBS S., DYBA M., EGNER A., AND HELL S. W., Fluorescence microscopy with diffraction resolution barrier broken by stimulated emission, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2000, **97**, 8206-8210.
- (8) WESTPHAL V., KASTRUP L. AND HELL S.W., Lateral resolution of 28nm ($\lambda/25$) in far-field fluorescence microscopy, 2003, Appl. Phys. B, 77, 377-380.
- (9) HELL S.W., JAKOBS S. AND KASTRUP L., Imaging and writing at the nanoscale with focused visible light through saturable optical transitions, Appl. Phys. A, 2003, **77**, 859-860.
- (10) HELL S.W., Toward fluorescence nano-scropy, Nature Biotech., 2003, **21**, 1347-1355.
- (11) DYBA M., JOKOBS S. AND HELL S.W., Immunofluorescence stimulated emission depletion microscopy, Nature Biotech., 2003, **21**, 1303-1304.
- (12) ZHANG J., CAMPBELL R.E., TING A.Y. AND TSIEN R.Y., Creating new fluorescent probes for cell biology, Nature Rev., 2002, **3**, 906-918.
- (13) TÖRÖK P. AND VARGA P., Electromagnetic diffraction of light focused through a stratified medium, Appl. Opt., 1997, **36**, 2305-2312.
- (14) HAEBERLÉ O., AMMAR M., FURUKAWA H., Tenjimbayashi K. and Török P., Opt. Exp., 2003, **11**, 2964-2969.
- (15) HAEBERLÉ O., Focusing of light through a stratified medium: a practical approach for computing microscope point spread functions. Part I: Conventional microscopy, Opt. Comm. 2003, **216**, 55-63.
- (16) HAEBERLÉ O., Focusing of light through a stratified medium : a practical approach for computing fluorescence microscope point spread functions. Part II: confocal and multiphoton microscopy, Opt. Comm., 2004, **235**, 1-10
- (17) HAEBERLÉ O., BICHA F., SIMLER C., DIETERLEN A., XU C., COLICCHIO C., JACQUEY S. AND GRAMMAIN M.-P., Identification of acquisition parameters from the point spread function of a fluorescence microscope, Opt. Comm., 2001, **196**, 109-117.
- (18) COLICCHIO B., XU C., HAEBERLÉ O., DIETERLEN A. AND JACQUEY S., "Monte-Carlo reconstruction of images from a PSF variant system", Focus on Microscopy 2002, April 4-7, 2004, Kaoshiung – Taiwan
- (19) PAWLEY J. B., "Limitations on optical sectioning in live-cell confocal microscopy, Scanning, 2002, **24**, 241-246.
- (20) HAEBERLÉ O., "The point spread function of optical microscopes imaging through layered and heterogeneous media", Focus on Microscopy 2004, April 4-7, 2004, Philadelphia - USA.
- (21) LAUER V., New approach to optical diffraction tomography yielding a vector equation of diffraction tomography and a novel tomographic microscope, J. Microscopy, 2000, **205**, 165-177.