



**HAL**  
open science

# AMÉLIORER LA RÉOLUTION DE LA MICROSCOPIE OPTIQUE DE FLUORESCENCE

Anne Sentenac

► **To cite this version:**

Anne Sentenac. AMÉLIORER LA RÉOLUTION DE LA MICROSCOPIE OPTIQUE DE FLUORESCENCE. Photoniques, 2022, 114, pp.45-50. 10.1051/photon/202111445 . hal-03877730

**HAL Id: hal-03877730**

**<https://hal.science/hal-03877730>**

Submitted on 29 Nov 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.



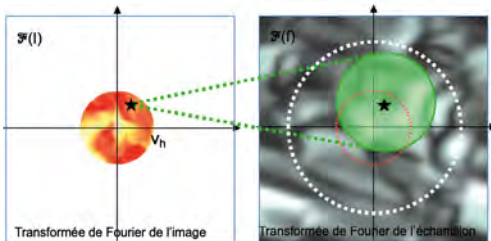
Distributed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License

# AMÉLIORER LA RÉOLUTION DE LA MICROSCOPIE OPTIQUE DE FLUORESCENCE

Anne SENTENAC<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Aix Marseille Univ, CNRS, Centrale Marseille, Institut Fresnel, 13013 Marseille, France

\*anne.sentenac@fresnel.fr



La microscopie de fluorescence est un outil majeur, en particulier pour étudier le fonctionnement du vivant au niveau cellulaire, mais sa résolution est limitée à quelques centaines de nanomètres. Ces vingt dernières années, différentes techniques ont été proposées pour descendre la résolution sous la barre des 100 nm. Cet article essaie de présenter leurs principes de manière unifiée.

<https://doi.org/10.1051/photon/202211445>

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.

Dans sa version moderne, le microscope optique est composé d'un objectif de très petite focale et d'une lentille « de tube » ayant une focale beaucoup plus grande. L'échantillon, inséré entre deux lamelles de verre, est éclairé de manière homogène par une lampe et la lumière transmise ou émise passe à travers l'objectif et la lentille de tube pour être captée par une caméra. Le rôle de l'objectif et de la lentille de tube est d'obtenir au niveau de la caméra placée au plan focal image du microscope une distribution d'intensité lumineuse la plus proche possible de celle existant dans l'échantillon au plan de mise au point

(appelé plan focal objet) avec un grossissement fixé par le rapport entre la focale de la lentille de tube et celle de l'objectif. Cependant, même avec un objectif parfait (et un grossissement unité pour simplifier la discussion), la distribution d'intensité est modifiée par la propagation de la lumière d'un plan à l'autre. En effet, les ondes électromagnétiques qui peuvent atteindre le plan d'observation ont une variation spatiale contrainte par leur longueur d'onde (nommée  $\lambda$  dans la suite de l'exposé) si bien que le motif d'intensité au plan image ne peut exhiber de fréquences spatiales supérieures à  $2/\lambda$ , voir Figure 1. La microscopie optique super-résolue répond donc à un défi fondamental: comment, à partir d'images dont la

fréquence spatiale maximum est  $2/\lambda$ , obtenir des informations sur les fréquences spatiales de l'échantillon plus grandes que  $2/\lambda$ . Les solutions proposées nécessitent de comprendre le lien entre l'image, qui correspond à une intensité lumineuse, et le paramètre de l'échantillon qui gouverne l'interaction lumière-matière, indice de réfraction pour les microscopes à transmission, ou densité de fluorescence pour les microscopes de fluorescence. Dans cet article, nous étudierons uniquement ces derniers car ils ont connu un essor spectaculaire grâce au développement de la chimie des fluorophores, et c'est dans ce cadre que la plupart des recherches sur la super-résolution ont été conduites.

### MODÉLISATION DE L'IMAGE D'UN MICROSCOPE DE FLUORESCENCE

Les fluorophores sont des molécules capables, lorsqu'elles sont éclairées à une certaine longueur d'onde  $\lambda_e$ , d'émettre de la lumière à une longueur d'onde  $\lambda$  légèrement plus grande. La possibilité de fixer les fluorophores sur n'importe quelle molécule d'intérêt (comme des protéines spécifiques) ont fait de cette technique de marquage un outil majeur pour étudier les processus moléculaires à l'œuvre dans les cellules et tissus vivants. Pour en tirer profit, le microscope optique s'est adapté : la lampe a été remplacée par des diodes lumineuses ou des lasers permettant d'obtenir un éclairage homogène à une longueur d'onde précise (vert) et un filtre spectral a été placé juste avant la caméra pour ne laisser passer que la lumière émise par les fluorophores (rouge). Les rayonnements émis par les fluorophores étant incohérents entre eux, l'intensité lumineuse enregistrée par la caméra au plan d'observation est la somme des intensités provenant de chaque fluorophore, Figure 2.

La capacité des fluorophores à émettre de la lumière dépend de leur nature, de leur environnement et de l'éclairage reçu. Dans les conditions standard (puissance incidente de quelques dizaines de watts par centimètre carré), les fluorophores les plus courants émettent proportionnellement à l'intensité de l'éclairage. Cependant, un travail important de recherche a été mené pour modifier ce comportement. En utilisant des molécules sophistiquées, des éclairages intenses (milliers de watts par centimètre carré) et/ou des milieux de montage particuliers, la fluorescence peut saturer, devenir stochastique ou même être inhibée.

Pour modéliser le lien entre l'image et l'échantillon, nous considérons le cas simplifié où l'échantillon, supposé infiniment fin et placé au plan focal objet, est représenté par sa densité (surfactive) de fluorescence  $f(\mathbf{r})$ . Nous introduisons une fonction d'excitation  $E(\mathbf{r})$  qui décrit la capacité à exciter (et donc à faire rayonner) localement un fluorophore placé en  $\mathbf{r}$ . Dans le régime standard,  $E(\mathbf{r})$  est

proportionnel à l'intensité de l'éclairage, en régime de saturation-inhibition,  $E(\mathbf{r})$  dépend de manière non linéaire de l'éclairage (avec en particulier des effets de seuil) et en régime stochastique,  $E(\mathbf{r})$  est une fonction aléatoire. Enfin, nous introduisons la fonction d'observation (fonction d'étalement du point)  $h$  correspondant à la distribution d'intensité lumineuse obtenue au plan image d'un fluorophore placé à l'origine. Avec ces notations, l'image peut être modélisée par :

$$I(\mathbf{r}) = \iint f(\mathbf{r}') E(\mathbf{r}') h(\mathbf{r}-\mathbf{r}') d\mathbf{r}' \quad (1)$$

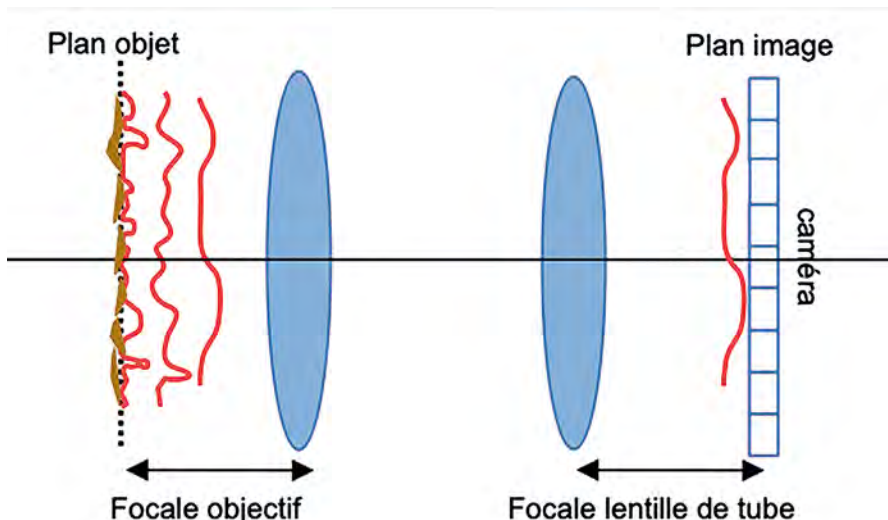
À cause de la propagation de la lumière jusqu'au plan image, la fonction d'observation  $h$  et l'image  $I$  ne contiennent aucune fréquence spatiale supérieure à  $\nu_h = 2/\lambda$  où  $\lambda$  est la longueur d'onde émise par les fluorophores. Autrement dit, leurs transformées de Fourier  $\mathcal{F}[h]$  et  $\mathcal{F}[I]$  valent zéro pour toutes les fréquences au delà de  $\nu_h$ . Quand l'excitation est uniforme,  $E(\mathbf{r})=A$ , ce qui est le cas en microscopie de fluorescence classique, la transformée de Fourier de l'image dépend de la transformée de Fourier de l'échantillon, via,

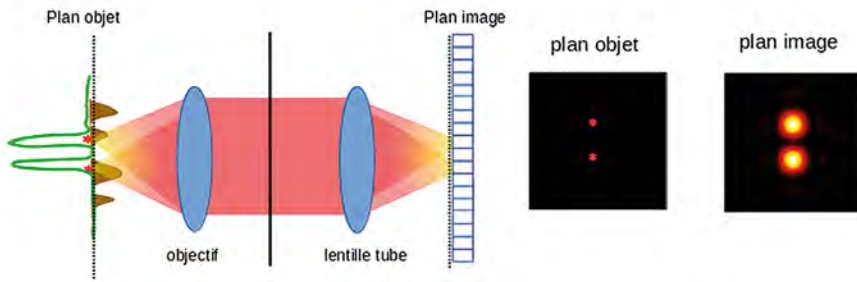
$$\mathcal{F}[I](\mathbf{v}) = \mathcal{F}[h](\mathbf{v}) \iint \mathcal{F}[f](\mathbf{v}-\mathbf{v}') \mathcal{F}[E](\mathbf{v}') d\mathbf{v}' \quad (2)$$

et l'on constate qu'elle est sensible aux fréquences spatiales de l'échantillon jusqu'à  $\nu_h + \nu_E$ , voir Figure 3.

Le fait qu'une image basse résolution puisse contenir des informations sur les fréquences élevées de l'échantillon est à la base de toutes les techniques de modulation : le signal (ici la densité de fluorescence,  $f$ ) est modulé par une porteuse (la fonction d'excitation,  $E$ ) pour être adapté au canal de transmission (le microscope,  $h$ , agissant comme un filtre passe bas). Toute la difficulté

**Figure 1 :** Schéma simplifié d'un microscope de grossissement unité. On a représenté en rouge l'intensité lumineuse (à la longueur d'onde  $\lambda$ ) transmise (ou émise) par l'échantillon (en marron) placé au plan objet et illustré la perte des fréquences spatiales élevées induite par la propagation de la lumière. L'intensité mesurée au niveau du plan focal image ne présente pas de fréquences spatiales supérieures à  $\nu_h = 2/\lambda$





**Figure 2 :** Schéma simplifié d'un microscope de fluorescence. Les fluorophores, représentés par une densité de fluorescence  $f$ , en marron, sont excités proportionnellement à une fonction d'excitation  $E$  (en vert) dépendant d'un éclairage à  $\lambda_E$ . Ils rayonnent à  $\lambda > \lambda_E$  (en rouge) et un filtre ne laisse passer que la lumière émise à  $\lambda$ . L'intensité lumineuse mesurée sur la caméra est la somme des intensités provenant de chaque fluorophore excité.

consiste à récupérer ces informations (le processus de démodulation). Dans la suite, nous présentons différentes techniques de microscopie super-résolues et nous distinguons celles qui utilisent une 'porteuse' déterministe de celles utilisant une porteuse stochastique, voir Figure 4.

**EXCITATION DÉTERMINISTE**

**Les microscopes super-résolus à balayage**

Dans les microscopes super-résolus les plus répandus, la 'porteuse' est une tache la plus petite possible obtenue en focalisant l'éclairage et translatée à la surface de l'échantillon. Lorsque le point de focalisation est en  $\mathbf{r}_0$ , la fonction d'excitation  $E_{\mathbf{r}_0}(\mathbf{r})$  (de fréquence spatiale maximale  $\nu_E$ ) s'écrit comme  $E(\mathbf{r}-\mathbf{r}_0)$  où  $E$  correspond à la tache centrée en 0. Pour chaque position  $\mathbf{r}_0$ , on peut enregistrer des images basse résolution,  $I(\mathbf{r}, \mathbf{r}_0) = \iint f(\mathbf{r}') E(\mathbf{r}' - \mathbf{r}_0) h(\mathbf{r} - \mathbf{r}') d\mathbf{r}'$ . En extrayant le pixel correspondant au point de focalisation, il est possible de construire une nouvelle image vérifiant  $I_{SR}(\mathbf{r}_0) = I(\mathbf{r}_0, \mathbf{r}_0) = \iint f(\mathbf{r}') E(\mathbf{r}' - \mathbf{r}_0) h(\mathbf{r}_0 - \mathbf{r}') d\mathbf{r}'$ . Cette dernière s'interprète comme la convolution de l'objet avec la fonction  $H(\mathbf{r}) = E(-\mathbf{r}) h(\mathbf{r})$ . Or, la fréquence spatiale maximale de  $H$ , qui est le produit des fonctions d'excitation et d'observation, est  $\nu_E + \nu_h$  (voir encart). Cette première technique de 'démodulation', qui correspond au microscope confocal, permet ainsi de remonter aux fréquences spatiales de l'échantillon jusqu'à  $\nu_E + \nu_h$ . Elle est très utilisée dans le régime d'excitation standard, où  $E(\mathbf{r})$  est

proportionnel à l'intensité du faisceau focalisé dont la fréquence maximale,  $\nu_E$ , ne peut dépasser  $2/\lambda_E$ . La résolution théoriquement atteignable, définie comme  $1/(\nu_E + \nu_h)$  est alors proche de  $\lambda/4$ , ( $\lambda_E$  étant très proche de  $\lambda$ ). La microscopie confocale a aussi été implémentée dans le régime d'inhibition appelé STED (pour Stimulated Emission Depletion). Dans ce cas,  $\nu_E$  peut être bien supérieur à  $2/\lambda_E$  car la fonction d'excitation dépend de manière non-linéaire de l'illumination (elle vaut 0 si la puissance d'éclairage dépasse une certaine valeur) et la résolution peut descendre bien en dessous de  $\lambda/4$ .

Une autre méthode de 'démodulation' appelée ISM (Image Scanning Microscopy) a été popularisée récemment dans le cadre de l'éclairage à balayage. Il a été proposé de former une image super-résolue en combinant numériquement tous les pixels des images basse-résolution  $I(\mathbf{r}, \mathbf{r}_0)$ , selon la formule  $I_{SR}(\mathbf{r}) = \iint I(\mathbf{r}-\mathbf{u}, \mathbf{r}+\mathbf{u}) d\mathbf{u}$ . On constate alors que  $I_{SR}$  s'écrit comme la convolution de l'objet avec une fonction  $H(\mathbf{r}) = \iint E(\mathbf{r}-\mathbf{u}) h(\mathbf{r}-\mathbf{u}) d\mathbf{u}$ , dont la transformée de Fourier,  $\mathcal{F}[H](\mathbf{v}) = \mathcal{F}[E](\mathbf{v}/2) \times \mathcal{F}[h](\mathbf{v}/2)$  présente une fréquence spatiale maximale qui est le double du minimum entre  $(\nu_E, \nu_h)$ . Lorsque  $\nu_E$  est proche de  $\nu_h$ , cette technique permet d'obtenir la résolution théorique d'un microscope confocal mais de manière beaucoup plus robuste, car, en tirant profit de la totalité des informations contenues dans les images basse-résolution, on améliore significativement le ratio signal sur bruit.

nobrainner.



**Lasers for Neuroscience**

Perfect solution for 2-photon Microscopy and Optogenetics

**FemtoFiber ultra 920 & 1050, vario 1030 HP**

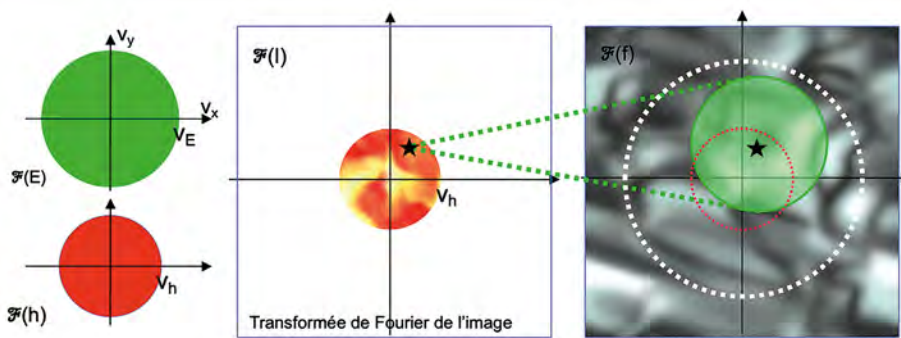
- Fully turn-key with integrated AOM and GDD
- No noise-stress for animals thanks to fully air-cooled design
- Compact laser design saving valuable table space
- Low cost of ownership using robust & reliable fiber-laser technology

learn more...



Distributed by **OPTON LASER INTERNATIONAL**





**Figure 3 :** La super-résolution vue dans le domaine de Fourier. À gauche, les disques verts et rouges de rayons respectifs  $v_E$  et  $v_h$  indiquent les supports en Fourier de la fonction d'excitation  $E$  et d'observation  $h$ . Au centre, la transformée de Fourier de l'image a le même support que la fonction d'observation alors que, à droite, la transformée de Fourier de l'échantillon a un support infini. La transformée de Fourier de l'image à la fréquence spatiale  $\mathbf{v}$  indiqué par l'étoile,  $\mathcal{F}(l)(\mathbf{v})$ , est sensible aux fréquences spatiales de l'échantillon situées dans le disque vert centré en  $\mathbf{v}$ . Le disque pointillé rouge indique le domaine fréquentiel de l'échantillon accessible lorsque la fonction d'excitation est homogène (disque vert réduit à un point). Le gain potentiel en résolution est indiqué par le disque pointillé blanc de rayon  $v_E + v_h$ .

### Les microscopes super-résolus à éclairage périodique

La deuxième grande famille des microscopes super-résolus à porteur déterministe, connue sous le nom de SIM (Structured Illumination Microscopy), utilise une fonction d'excitation périodique. Dans les implémentations classiques, cette dernière est obtenue en faisant interférer deux faisceaux collimatés et peut se modéliser par

$E(\mathbf{r}) = 1 + \cos(2\pi\mathbf{v}_E \cdot \mathbf{r} + \theta)$ . La transformée de Fourier de l'image prise avec un tel éclairage (Eq. 2) fait alors intervenir la somme de trois coefficients de Fourier de l'échantillon à la fréquence en  $\mathbf{v}$ ,  $\mathbf{v} + \mathbf{v}_E$  et  $\mathbf{v} - \mathbf{v}_E$ ,

$$\mathcal{F}[I](\mathbf{v}) = 0.5 \mathcal{F}[h](\mathbf{v}) \{ e^{-i\theta} \mathcal{F}[f](\mathbf{v} - \mathbf{v}_E) + 2\mathcal{F}[f](\mathbf{v}) + e^{i\theta} \mathcal{F}[f](\mathbf{v} + \mathbf{v}_E) \}. \quad (3)$$

En traduisant la grille de lumière (en prenant trois angles  $\theta$  différents), on

obtient un système linéaire de trois équations à trois inconnues dont la résolution (numérique) permet d'estimer les trois coefficients de Fourier de l'échantillon,  $(\mathcal{F}[f](\mathbf{v} - \mathbf{v}_E); \mathcal{F}[f](\mathbf{v})$  et  $\mathcal{F}[f](\mathbf{v} + \mathbf{v}_E))$  et ce, pour tout  $\mathbf{v} < v_h$ . En tournant la grille de lumière (pour changer la direction de  $\mathbf{v}_E$ ), on arrive ainsi à estimer la transformée de l'échantillon jusqu'à  $v_h + v_E$ , comme avec le confocal. SIM, qui est une technique d'imagerie large champ (tout l'échantillon est éclairé) a été essentiellement développée dans le régime d'excitation standard même si quelques expériences ont été menées en régime de saturation/inhibition (avec, dans ce cas,  $v_E$  significativement plus grand que  $2/\lambda_E$ ).

Pour construire l'image super-résolue de l'échantillon, les approches de démodulation que nous venons de voir requièrent la connaissance de la 'porteuse' (le déplacement de la tache pour le confocal, et la période et position de la grille de lumière pour le SIM) ce qui nécessite des efforts expérimentaux importants pour la contrôler. Nous allons maintenant étudier les approches qui utilisent une excitation stochastique et évitent donc cette difficulté.

### EXCITATION STOCHASTIQUE

#### Les microscopes à éclairage de speckle

Dans RIM (Random Illumination Microscopy), l'excitation de la fluorescence est obtenue en éclairant l'échantillon avec l'intensité lumineuse tavelée (speckle) d'un faisceau laser ayant traversé un diffuseur. Dans le régime standard, la fonction d'excitation  $E$  est proportionnelle à l'intensité des speckles et présente une fréquence maximale  $v_E = 2/\lambda_E$  comme la tache de focalisation du confocal ou la grille de lumière de SIM. Ainsi, l'image basse résolution obtenue avec un éclairage de speckle est sensible aux fréquences spatiales de l'échantillon jusqu'à  $v_h + v_E$ . L'intensité de speckle (et donc la fonction d'excitation) est inconnue mais elle obéit à des lois statistiques bien établies.

### RAPPELS SUR LA TRANSFORMÉE DE FOURIER.

La transformée de Fourier d'une fonction  $f$  est définie par :  $\mathcal{F}[f](\mathbf{v}) = \int f(\mathbf{r}) \exp(2i\pi\mathbf{v} \cdot \mathbf{r}) d\mathbf{r}$  Le produit de convolution de deux fonctions  $l$  et  $k$  est défini par,  $l \otimes k(\mathbf{r}) = \int l(\mathbf{r} - \mathbf{r}') k(\mathbf{r}') d\mathbf{r}'$

La transformée de Fourier du produit de convolution de deux fonctions est égale au produit des transformées de Fourier,  $\mathcal{F}[l \otimes k](\mathbf{v}) = \mathcal{F}[l](\mathbf{v}) \times \mathcal{F}[k](\mathbf{v})$ .

De même, la transformée de Fourier du produit de deux fonctions est égale au produit de convolution des transformées de Fourier,

On a  $\mathcal{F}[lk](\mathbf{v}) = \mathcal{F}[l](\mathbf{v}) \otimes \mathcal{F}[k](\mathbf{v}) = \int \mathcal{F}[l](\mathbf{v} - \mathbf{v}') \mathcal{F}[k](\mathbf{v}') d\mathbf{v}'$ .

Si  $\mathcal{F}[l](\mathbf{v}) = 0$  pour  $v > v_h$  et  $\mathcal{F}[k](\mathbf{v}) = 0$  pour  $v > v_E$  alors  $\mathcal{F}[lk](\mathbf{v}) = 0$

pour  $v > v_h + v_E$ . La transformée de Fourier de  $f^2$  est égale à l'autoconvolution de la transformée de Fourier de  $f$ . Si le support de  $\mathcal{F}[f]$  est un disque de rayon  $v_h$  alors le support de  $\mathcal{F}[f^2]$  est un disque de rayon  $2v_h$ .

Elle peut être modélisée comme une fonction aléatoire spatialement corrélée de moyenne  $\langle E \rangle$  constante et de covariance  $\langle E(\mathbf{r})E(\mathbf{r}') \rangle - \langle E \rangle^2 = C(\mathbf{r}-\mathbf{r}')$  où  $C$ , la fonction d'autocorrélation des speckles, renseigne sur la taille moyenne des tavelures. La fonction  $C$  est bien connue et est égale à  $h$  si l'éclairement est formé à travers le même objectif que celui utilisé pour l'observation de la fluorescence (et  $\lambda_E$  proche de  $\lambda$ ). Le principe de RIM consiste à étudier la statistique des images enregistrées pour différentes réalisations de speckles (en faisant tourner le diffuseur par exemple). On remplace ainsi la connaissance des éclairagements, nécessaire dans les techniques à porteuse déterministe, par la connaissance de la statistique des éclairagements. Plus précisément, l'image super-résolue de l'objet, est reconstruite à partir de la variance des images enregistrées,

$$\text{Var}(I(\mathbf{r})) = \langle I^2(\mathbf{r}) \rangle - \langle I \rangle^2(\mathbf{r}).$$

On remarque que  $\text{Var}(I)$ , du fait du carré de  $I$ , contient des fréquences spatiales jusqu'à  $2v_h$  et qu'elle dépend de manière quadratique de l'échantillon  $f$ ,

$$\text{Var}(I(\mathbf{r})) = \langle I^2(\mathbf{r}) \rangle - \langle I \rangle^2(\mathbf{r}) = \iint h(\mathbf{r}-\mathbf{r}_1) f(\mathbf{r}_1) C(\mathbf{r}_1-\mathbf{r}_2) f(\mathbf{r}_2) h(\mathbf{r}-\mathbf{r}_2) d\mathbf{r}_1 d\mathbf{r}_2. \quad (4)$$

Le point clé de RIM réside dans la démonstration mathématique que, si  $v_E = v_h$ , il y a une bijection entre les fréquences spatiales de la variance et celles de l'échantillon dans le disque de rayon  $2v_h$ . En pratique,  $f$  est estimée de manière itérative de telle sorte que la variance modèle, Eq. 3, se rapproche le plus possible de la variance expérimentale.

### Les microscopes à fluorescence clignotante

Dans SOFI (Stochastic Optical Fluctuation Imaging), l'excitation des fluorophores est aussi aléatoire mais le processus n'est pas lié à la variation de l'éclairement (qui est uniforme) mais au comportement des fluorophores eux mêmes dont la tendance à clignoter a été encouragée. Dans la représentation continue de l'échantillon que nous avons choisie, cela revient à écrire que l'excitation  $E$  est formée de pics très étroits (ou pics de Dirac), placés de manière aléatoire et non corrélée de telle sorte que  $C(\mathbf{r}-\mathbf{r}') = \langle E(\mathbf{r})E(\mathbf{r}') \rangle - \langle E \rangle^2 = \delta(\mathbf{r}-\mathbf{r}')$ . Ici, le support en Fourier de  $E$  n'est pas borné ( $v_E = \infty$ ). Comme pour RIM, on enregistre de multiples images correspondant à différentes réalisations

de  $E$  et on calcule leur variance avec l'Eq. 3. Rappelant que  $C(\mathbf{r}_1-\mathbf{r}_2) = \delta(\mathbf{r}_1-\mathbf{r}_2)$ , l'expression se simplifie pour donner  $\text{Var}(I(\mathbf{r})) = \langle I^2(\mathbf{r}) \rangle - \langle I \rangle^2(\mathbf{r}) = \iint h^2(\mathbf{r}-\mathbf{r}_1) f^2(\mathbf{r}_1) d\mathbf{r}_1$ . Ainsi, la variance des images basse-résolution de SOFI s'écrit comme la convolution de l'objet au carré par la fonction d'observation au carré. Elle permet donc de récupérer les fréquences spatiales de  $f^2$  jusqu'à  $2v_h$ . Cependant, connaître la transformée de Fourier de  $f^2$  jusqu'à  $2v_h$  ne permet pas de connaître celle de  $f$  jusqu'à  $2v_h$  (quel que soit  $\mathbf{v}$ ,  $\mathcal{F}[f^2](\mathbf{v})$  dépend de toutes les fréquences de  $f$ ). Contrairement à toutes les techniques précédemment étudiées, l'image super-résolue de SOFI ne dépend pas linéairement de  $f$  : l'image de deux objets ne correspond pas à la somme des images des objets pris séparément. Son interprétation doit alors se faire avec précaution, si possible en utilisant des informations *a priori* sur l'objet. Par exemple, si  $f$  est binaire, ne prenant que deux valeurs, 0 ou 1,  $f^2 = f$  et l'image de variance correspond à l'image super-résolue de l'objet.

### Les microscopes à localisation

Le rôle de l'information *a priori* pour extrapoler les fréquences ●●●

SPECTROGON

State of the art products

#### Filtres Interférentiels

De 200 à 15000 nm

- Passe-bande
- Passe-haut
- Passe-bas
- Large bande
- Densité neutre
- Disponible en stock

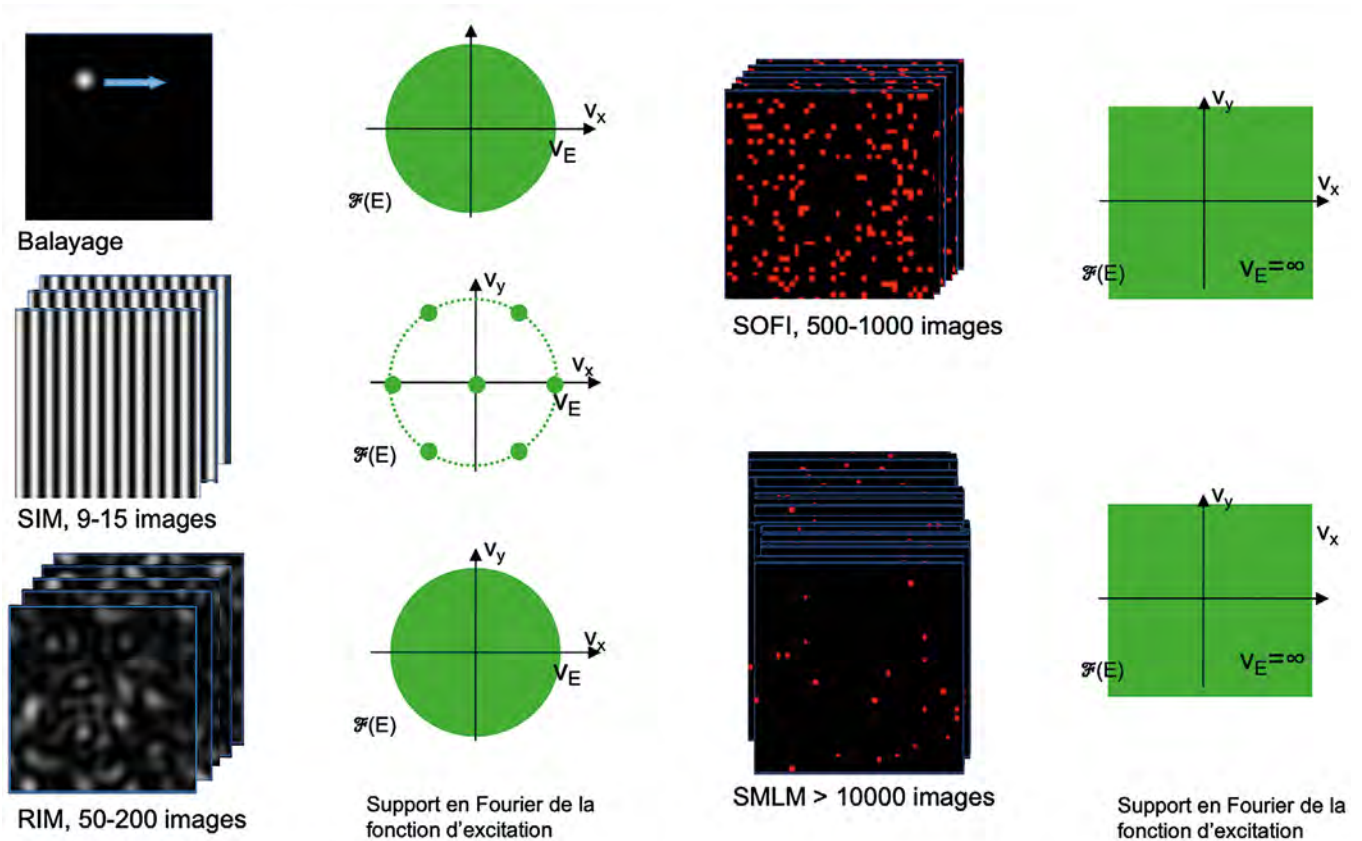
#### Réseaux Holographiques

De 150 à 2000 nm

- Compression d'impulsion
- Télècom
- Accordabilité spectrale
- Monochromateurs
- Spectroscopie
- Disponible en stock

UK (parle français): sales.uk@spectrogon.com • Tel +44 1592770000  
 Sweden (headquarters): sales.se@spectrogon.com • Tel +46 86382800  
 US: sales.us@spectrogon.com • Tel +1 9733311191

www.spectrogon.com



spatiales de l'échantillon bien au-delà de  $v_h$  est à la base des méthodes SMLM (Single Molecule Localization Microscopy). Comme dans SOFI, l'excitation SMLM des fluorophores est aléatoire et décorrélée spatialement mais l'éclairement est optimisé pour que la densité des fluorophores excités soit très faible. L'excitation  $E$  est formée de pics très étroits à grande distance les uns des autres. L'image obtenue se présente comme une collection de taches que l'on suppose sans chevauchement. Le centre  $\mathbf{r}_q$  et l'intensité des taches permet d'estimer  $f(\mathbf{r}_q)$ . En enregistrant des milliers d'images (et en supposant que  $\langle E \rangle$  est une constante asymptotiquement) on peut théoriquement reconstruire  $f$  avec une précision infinie.

### CONCLUSION

Nous avons vu dans cette représentation unifiée, les différentes approches qui ont été développées pour obtenir des images super-résolues d'échantillons fluorescents. Les limites théoriques de résolution qui

**Figure 4 :** Fonctions d'excitation des différentes techniques de microscopie super-résolue et leurs supports dans le domaine de Fourier. En régime de fluorescence standard, l'excitation est proportionnelle à l'intensité d'éclairement et  $v_E$  vaut  $2/\lambda_E$  au mieux. Les microscopies SIM et RIM sont principalement utilisées dans le régime standard. La microscopie à balayage est utilisée dans le régime standard et le régime d'inhibition/saturation STED (dans ce cas,  $v_E$  peut atteindre  $20/\lambda_E$ ). Les microscopies SOFI et SMLM fonctionnent dans le régime d'excitation stochastique et  $v_E$  est infini. Pour chaque technique, on a indiqué le nombre d'images basse-résolution nécessaires en pratique pour former une image super-résolue de l'échantillon.

ont été présentées sont cependant rarement atteintes. Les causes principales de détérioration des performances sont : le bruit de mesure, qui pollue particulièrement les hautes fréquences des images basse-résolution, les incertitudes sur les fonctions d'excitation déterministes (dus aux aberrations ou aux imperfections des réglages), qui entraînent des artefacts lors de la reconstruction de l'image super-résolue, et le nombre fini d'images des méthodes stochastiques qui empêche de sonder l'échantillon de manière uniforme. En pratique, si la résolution des meilleurs microscopes de fluorescence à

éclairage homogène est de l'ordre de 200-300 nm, celle des microscopes super-résolus s'approche de 100-120 nm en régime d'éclairement standard (SIM et RIM) et 20-50 nm en STED ou SMLM. ●

### RÉFÉRENCES

K. Prakash *et al.*, *Philos. Trans. R. Soc.*, A 379, 20200143 (2021)

L. Schermelleh *et al.*, *Nat. Cell Biol.* 21, 72-84 (2019)