

La microscopie optique au XXIème siècle : de la physique au service de la biologie.

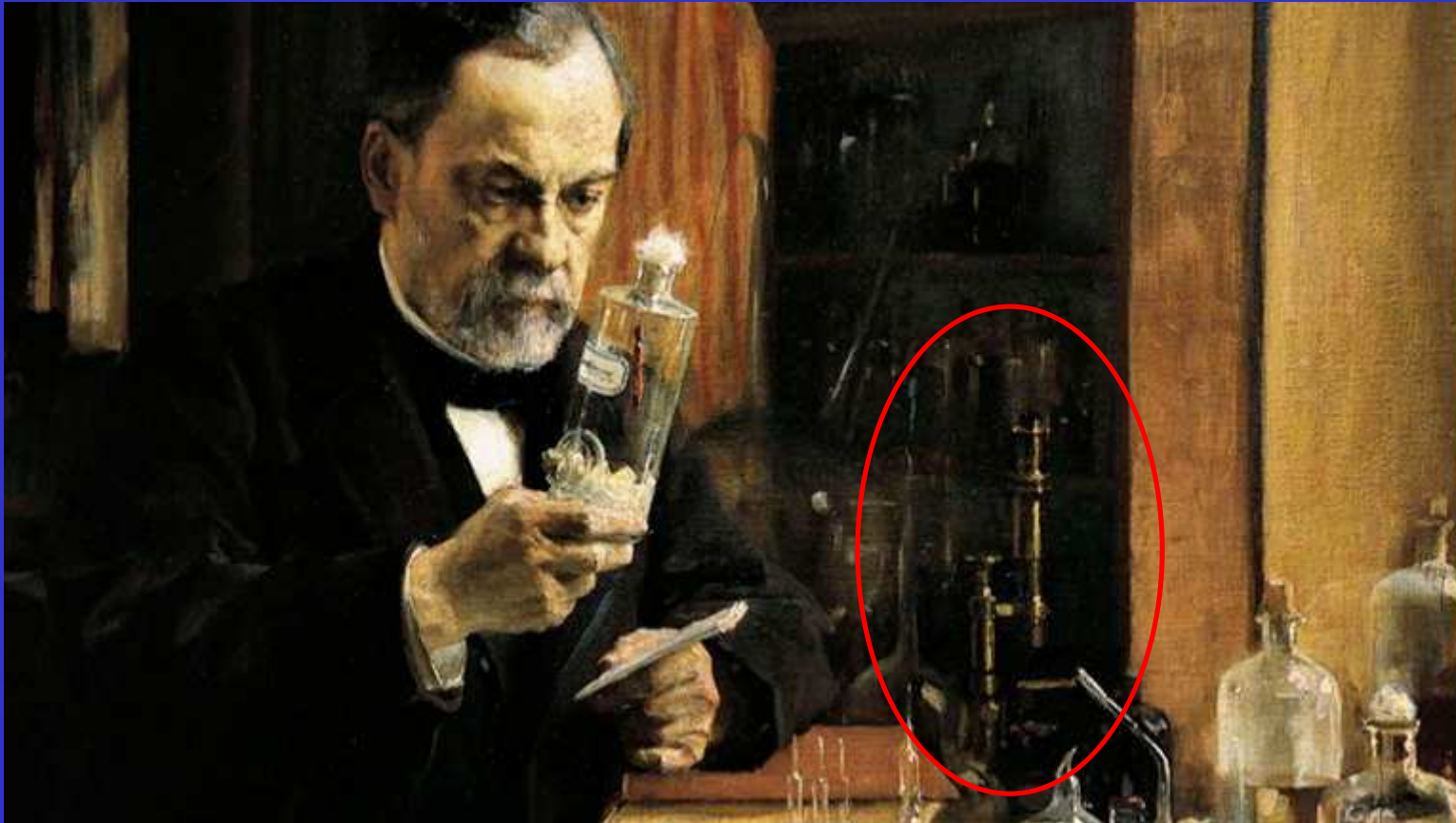
Jacques DEROUARD

Professeur émérite

Laboratoire Interdisciplinaire de Physique (LIPhy)



Microscopie et biologie



Pasteur dans son laboratoire, Alfred EDEFELT, 1885, Musée d'Orsay

La microscopie optique au XXIème siècle

- Des origines à nos jours
- De l'imagerie morphologique à l'« imagerie fonctionnelle moléculaire »: la microscopie de fluorescence
- Quelques développements récents:
 - Imagerie « non linéaire »
 - Optique adaptative

La microscopie optique au XXIème siècle

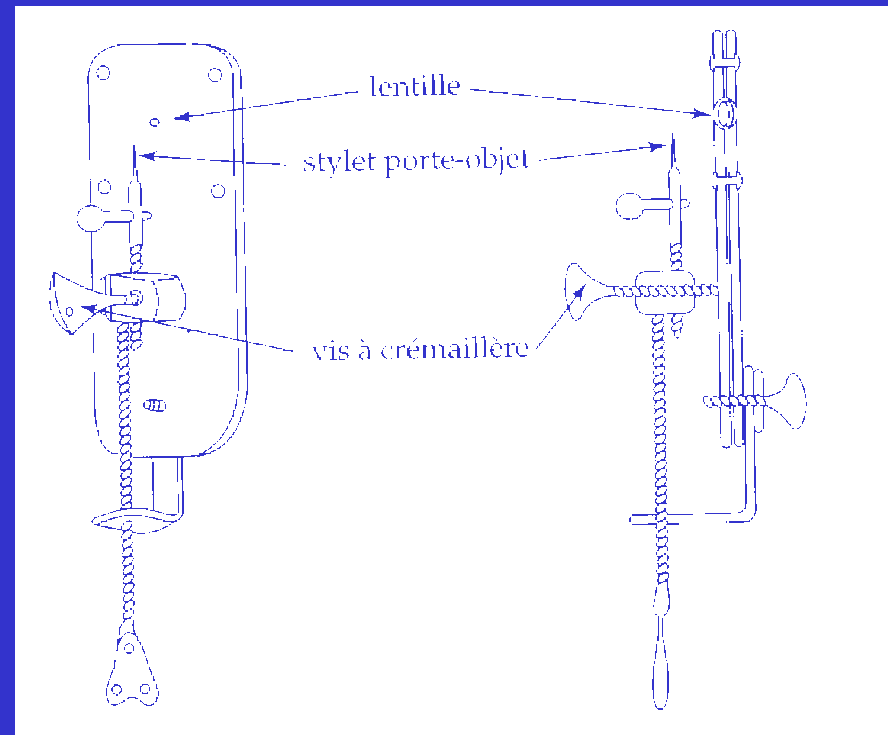
- NB Conférence D. Bourgeois Ateliers de l'Information 16 juin 2015:
 - « Microscopie de fluorescence, super résolution, sujet du prix Nobel de Chimie 2014 »

La préhistoire

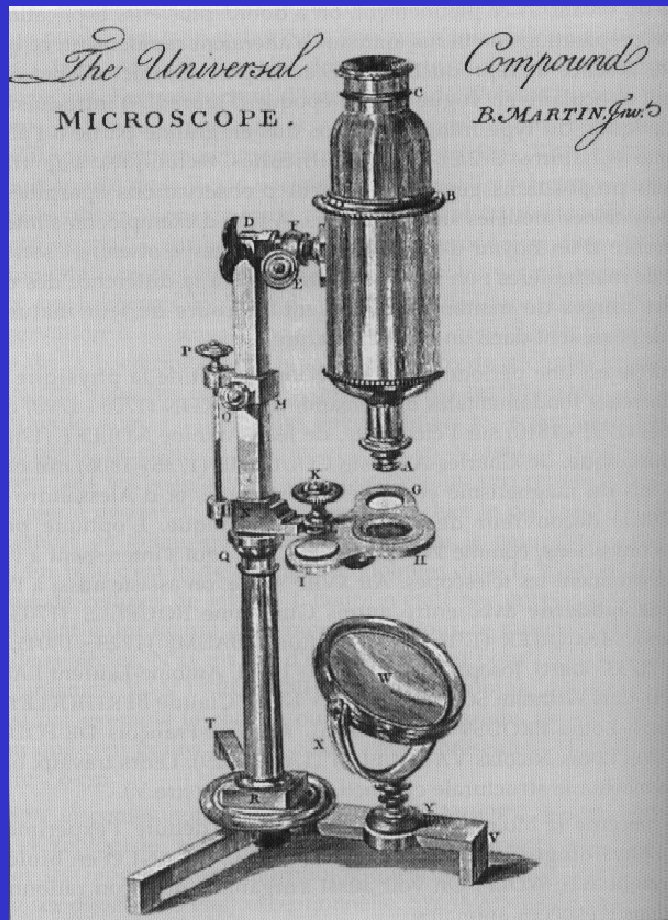


Van Leeuwenhoek (1632-1723)

La préhistoire



La préhistoire



Microscope
composé
18ème siècle

(cf aussi Hooke
contemporain de
van Leewenhoek)

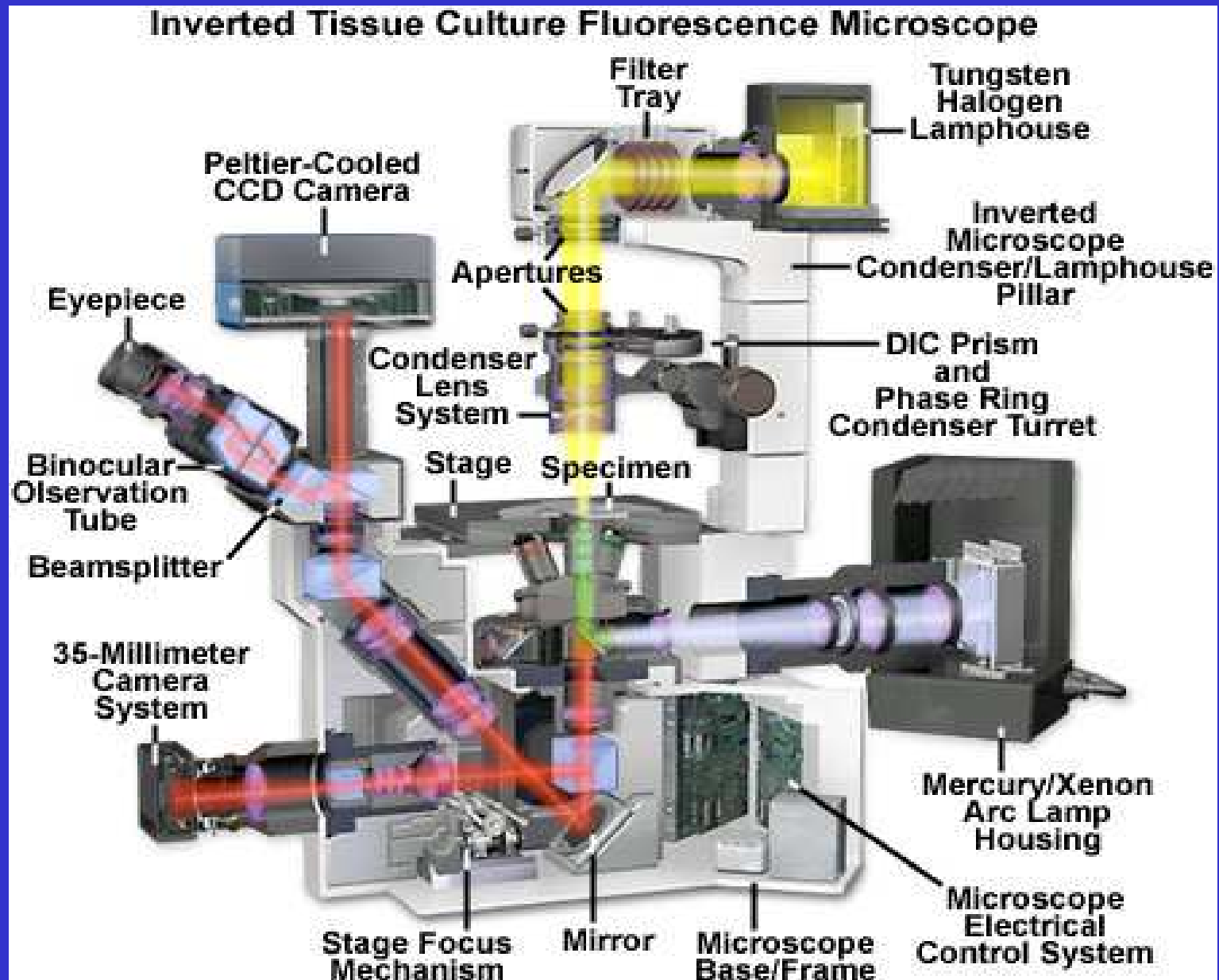
L'Histoire



Microscope Zeiss
(1885)

NB Collaboration Abbe -
Schott - Zeiss

Microscope optique début du 21ème siècle



Microscopie optique et biologie

- Imagerie **morphologique** d'objets biologiques **transparents** observés en transmission

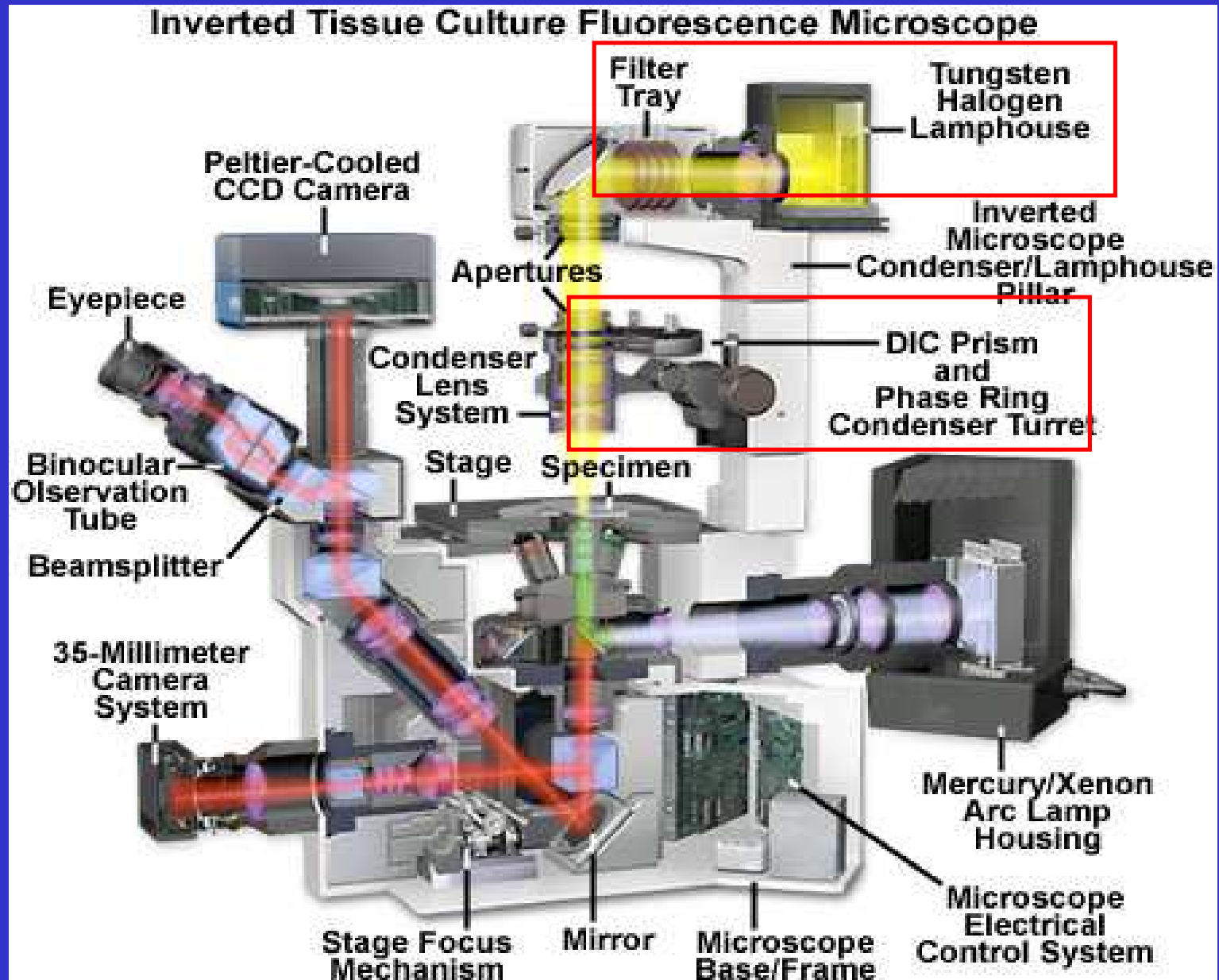
- contraste de phase
- contraste interférentiel

Milieu **inhomogénéité d'indice δn**
épaisseur e :
déphasage

$$\frac{2\pi}{\lambda} \delta n \cdot e$$

- coloration (membrane, noyaux...) de cellules
« fixées », c'est-à-dire mortes!

Microscope optique

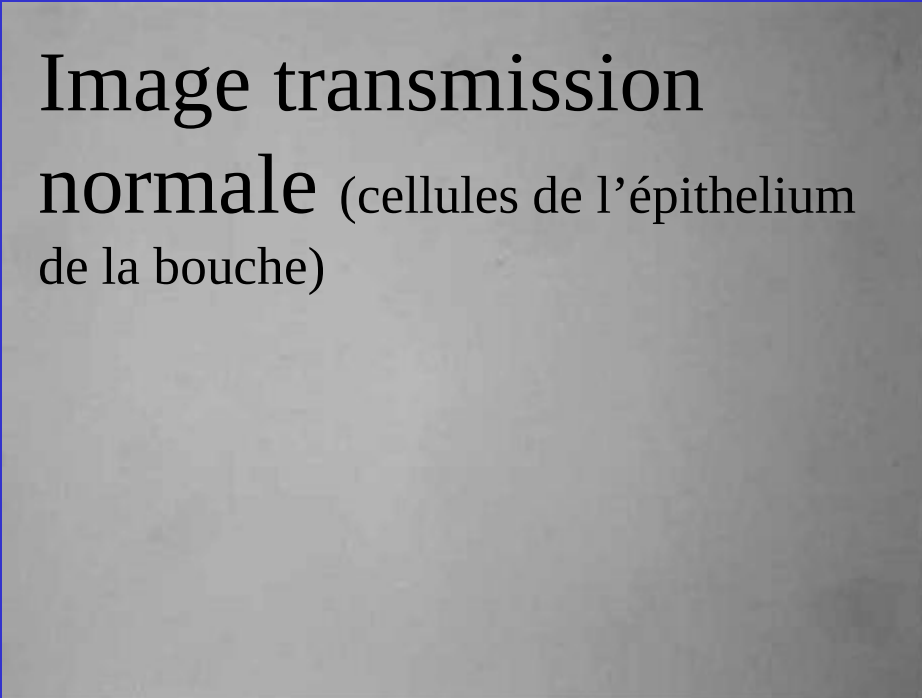


Microscopie optique morphologique

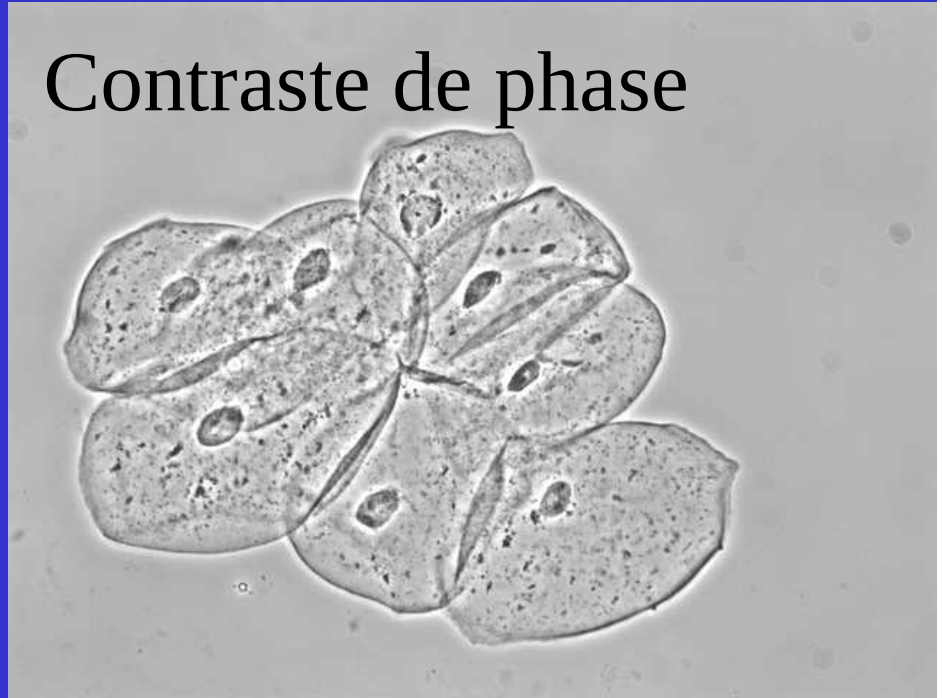
- Contraste de phase (Zernike, 1935, Prix Nobel de Physique 1953)

Image transmission

normale (cellules de l'épithélium
de la bouche)

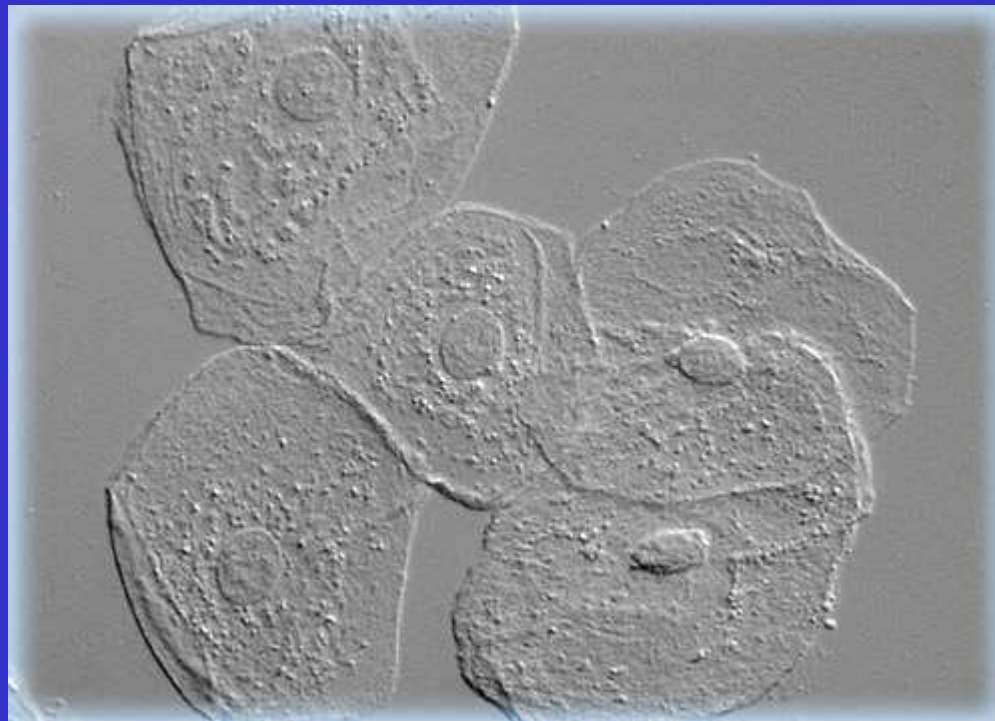


Contraste de phase



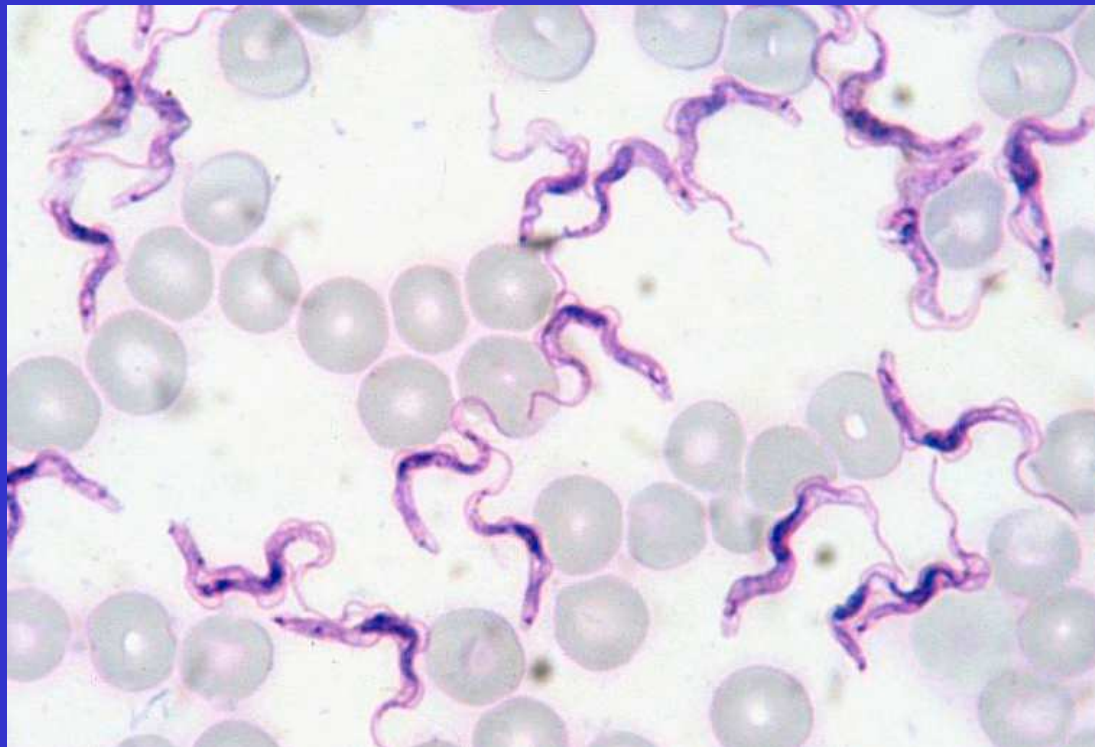
Microscopie optique morphologique

- Contraste interférentiel (Nomarski, 1955)



Microscopie optique morphologique

- Colorants en introduits en quantité suffisante
(-> cellules « fixées » = mortes!) pour
absorber la lumière et colorer la lumière



Sang de rat infecté par
« trypanosoma - evansi ». Marquage par coloration
bleu de méthylène-éosine
(crédit wikimedia, A.R. Walker)

Microscopie optique et biologie

- Imagerie morphologique d'objets transparents
- **Imagerie « fonctionnelle »**
 - détection, localisation et comportement de molécules impliquées dans le fonctionnement cellulaire
 - cf protéines, ADN, Ca^{++} ...



Imagerie « moléculaire »

Microscopie et biologie:

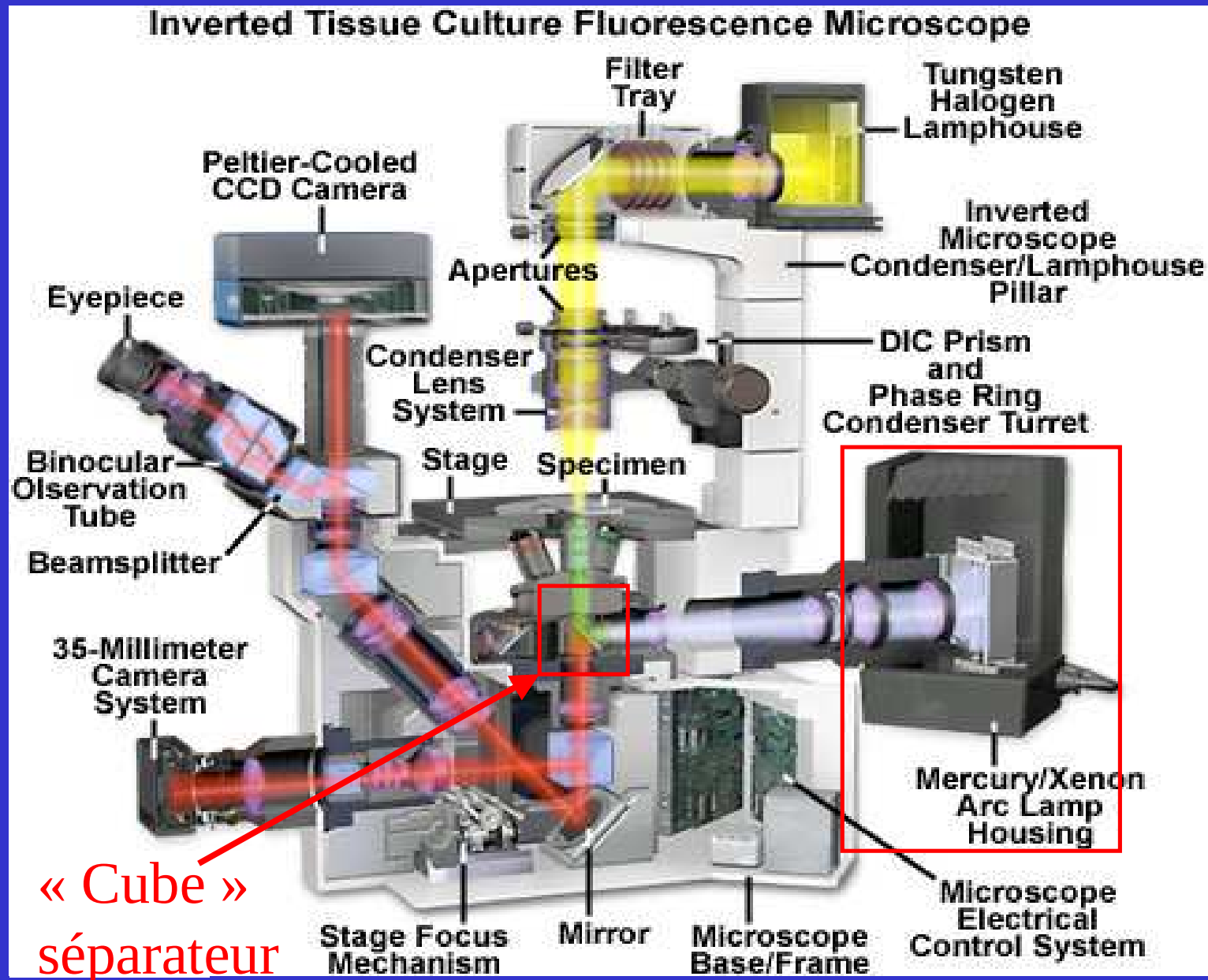
Imagerie moléculaire fonctionnelle

- Marquage par des **molécules fluorescentes**: émettent de la lumière de couleur différente de celle de l'éclairage.

Filtre coloré → observation sur « fond noir »

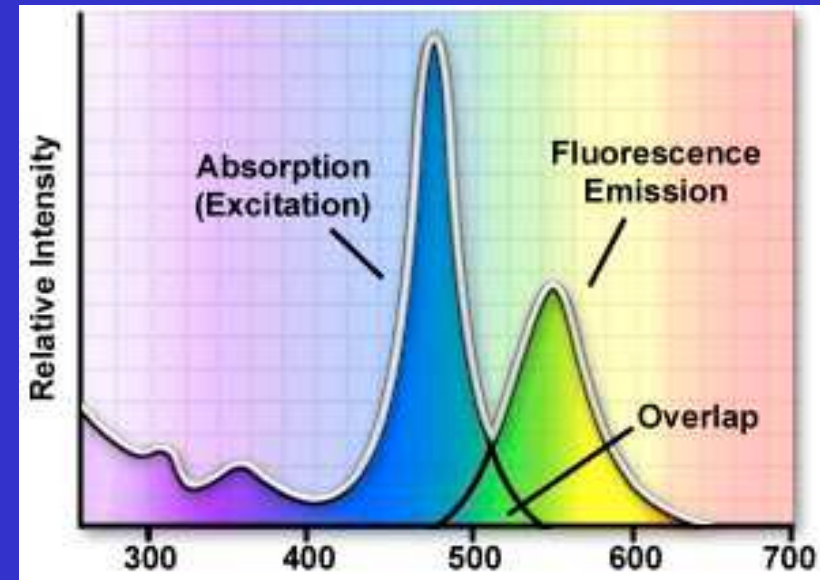
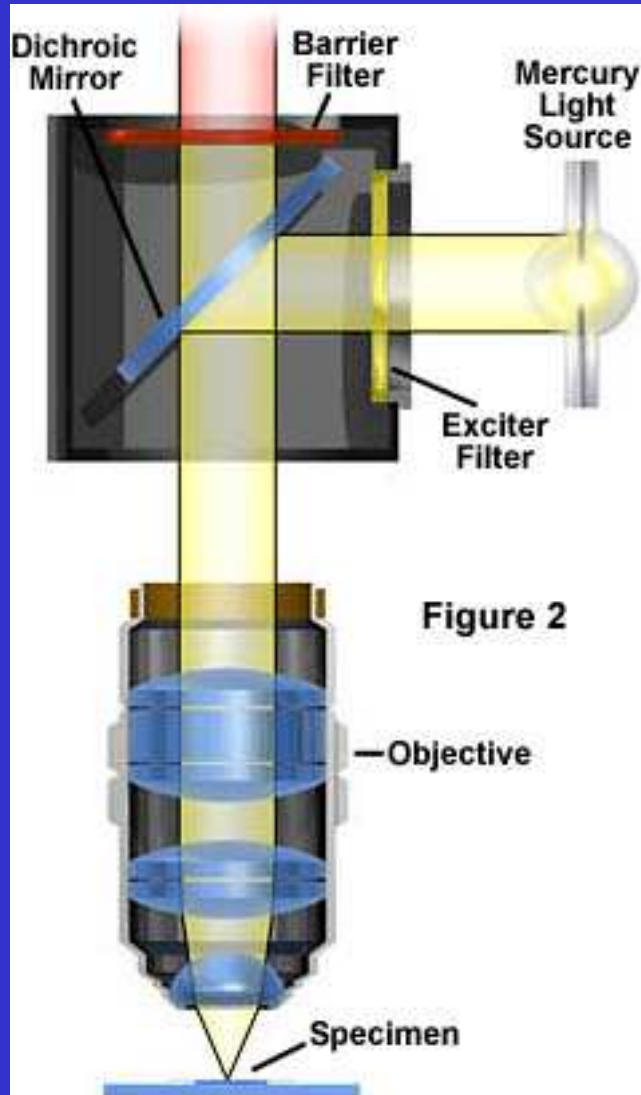
- **Très grande sensibilité**: une molécule individuelle est déjà détectable (plus facile de voir les étoiles la nuit qu'en plein jour!)

Microscope optique de fluorescence



Détection de lumière de fluorescence:

« Cube » séparateur avec filtres



Spectres d'absorption et de fluorescence d'un colorant fluorescent

Microscopie et biologie:

Imagerie moléculaire de fluorescence

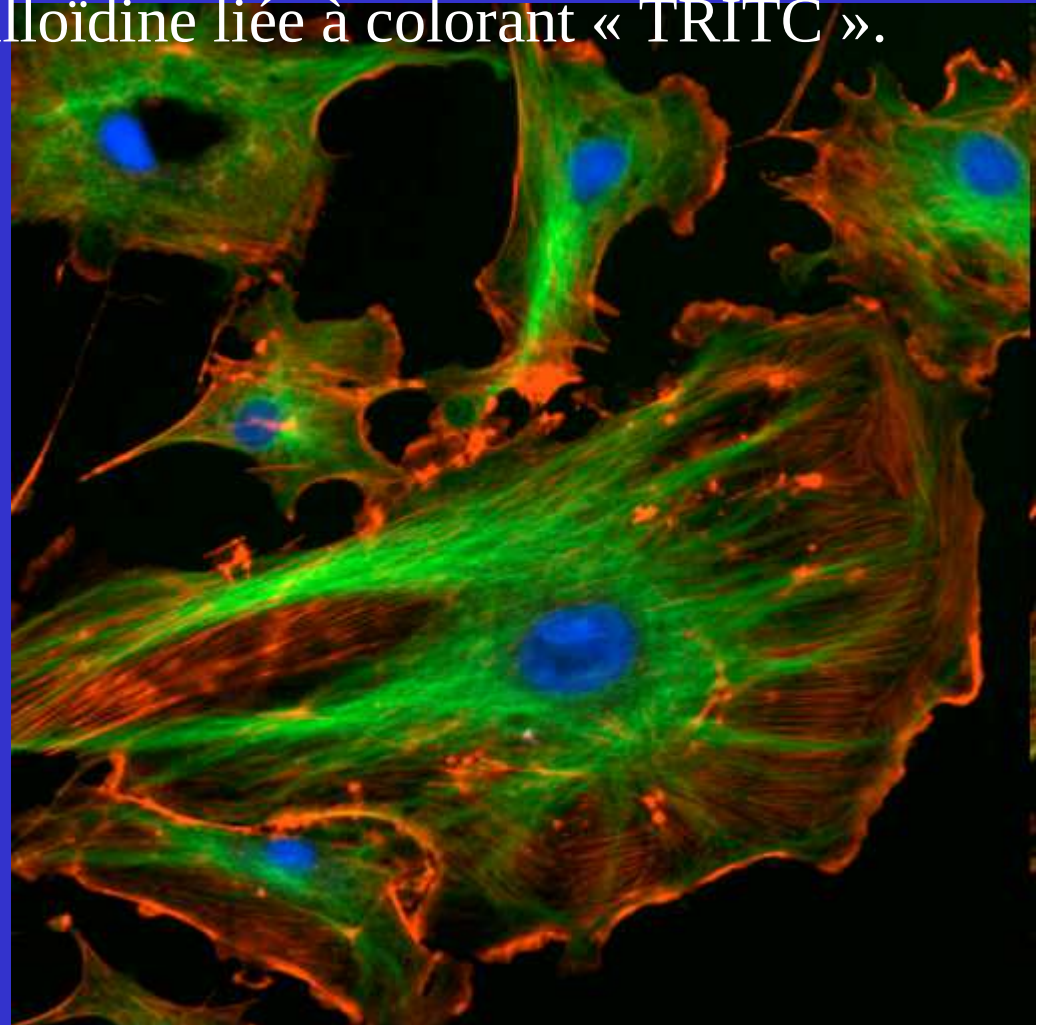
- Marquage par des molécules fluorescentes émettant de la lumière de couleur différente de celle de l'éclairage
 - cf « DAPI », se lie spécifiquement à ADN
 - cf greffage de molécules fluorescentes sur un **anticorps** qui s'attache spécifiquement sur une protéine donnée: permet d'obtenir une image montrant la localisation de la protéine en question

Cellules endothéliales d'artère pulmonaire bovine vues au microscope après fixation et marquage par 3 types de molécules fluorescentes de différentes couleurs.

En bleu, noyaux marqués au DAPI.

En vert, microtubules marqués par un anticorps.

En rouge, actine marquée à la phalloïdine liée à colorant « TRITC ».



<http://rsb.info.nih.gov/ij/images/>

Microscopie et biologie:

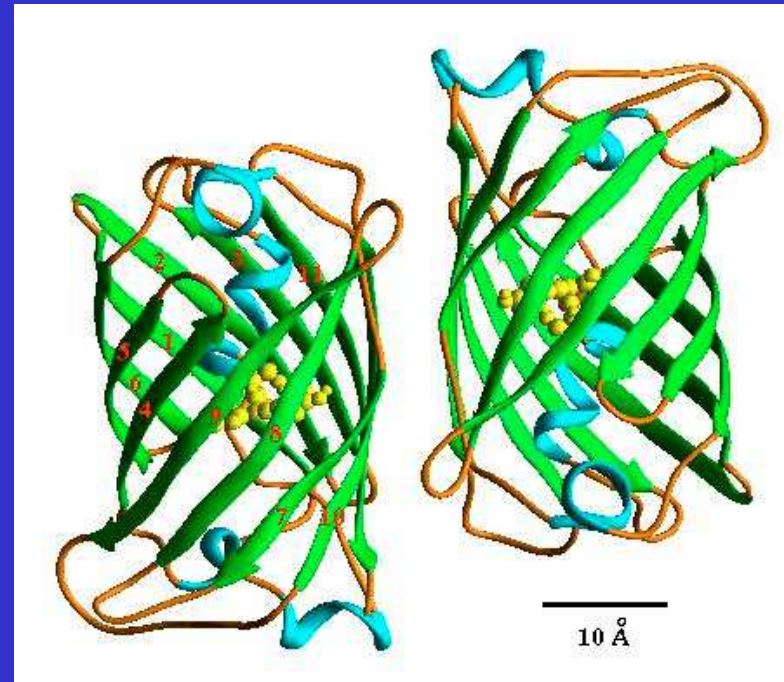
Imagerie moléculaire de fluorescence

- Marquage par des molécules fluorescentes émettant de la lumière de couleur différente de celle de l'éclairage
 - **protéines fluorescentes** synthétisées directement par des **organismes génétiquement modifiés** pour cela (cf R. Tsien, M. Chalfie, O. Shimomura, prix Nobel de chimie 2008)
 - permet **l'imagerie moléculaire au sein de cellules vivantes**

Le prix Nobel de chimie 2008

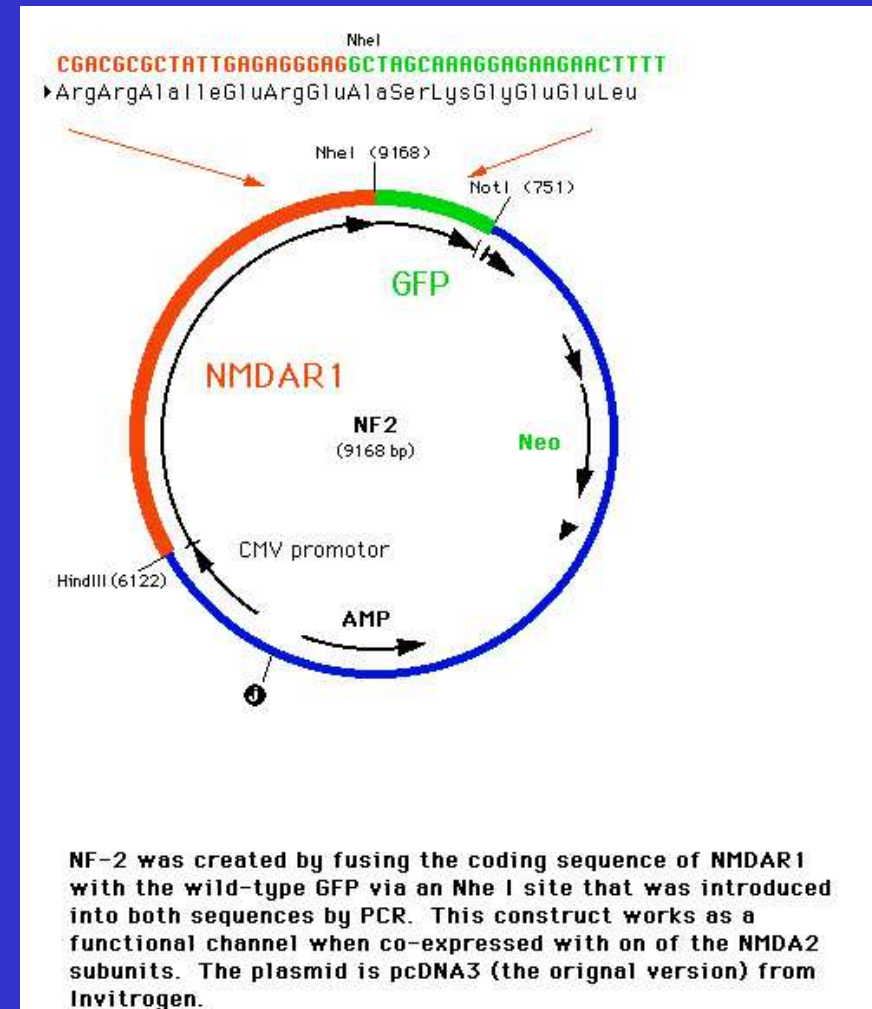
(R. Tsien, M. Chalfie, O. Shimomura)

- Molécule « Green Fluorescent Protein » présente naturellement chez certaines méduses



Protéines fluorescentes et génie génétique

- Organismes peuvent être génétiquement modifiés pour fabriquer des protéines « fusionnées » avec cette protéine fluorescente

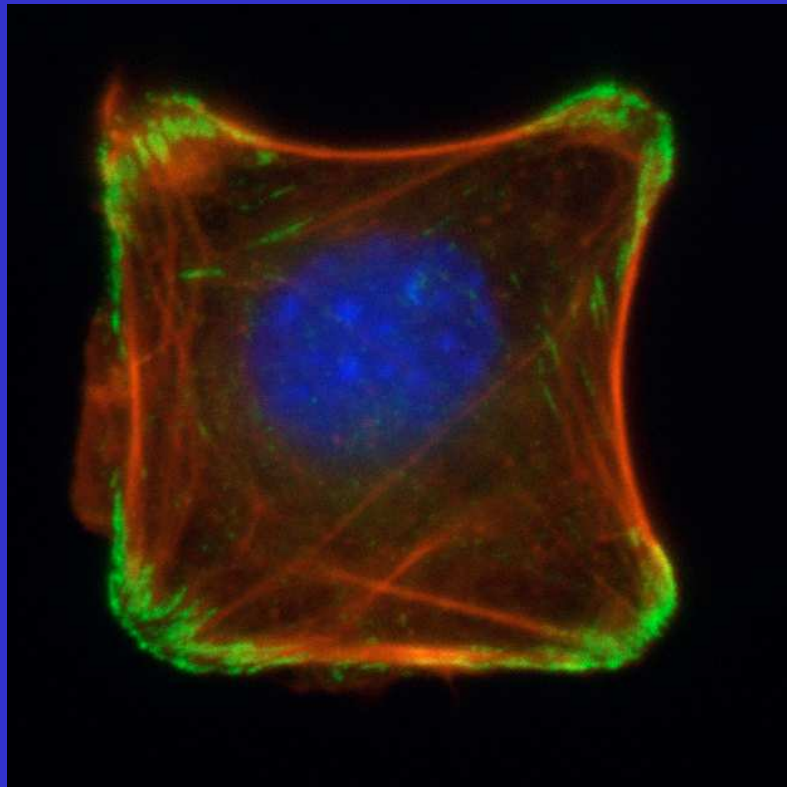


Protéines fluorescentes et génie génétique

- Organismes peuvent être génétiquement modifiés pour fabriquer des protéines « fusionnées » avec cette protéine GFP



Microscopie et biologie: Imagerie moléculaire de fluorescence



Cellule OGM / Protéines fluorescentes

Rouge: actine(« cytosquelette »)
- **redFP**

Vert : Paxilline (protéine adhésion)
- **GFP**

Bleu: ADN, marqueur DAPI

M. Balland (LIPhy) *et al*, 2015

Protéines fluorescentes et génie génétique

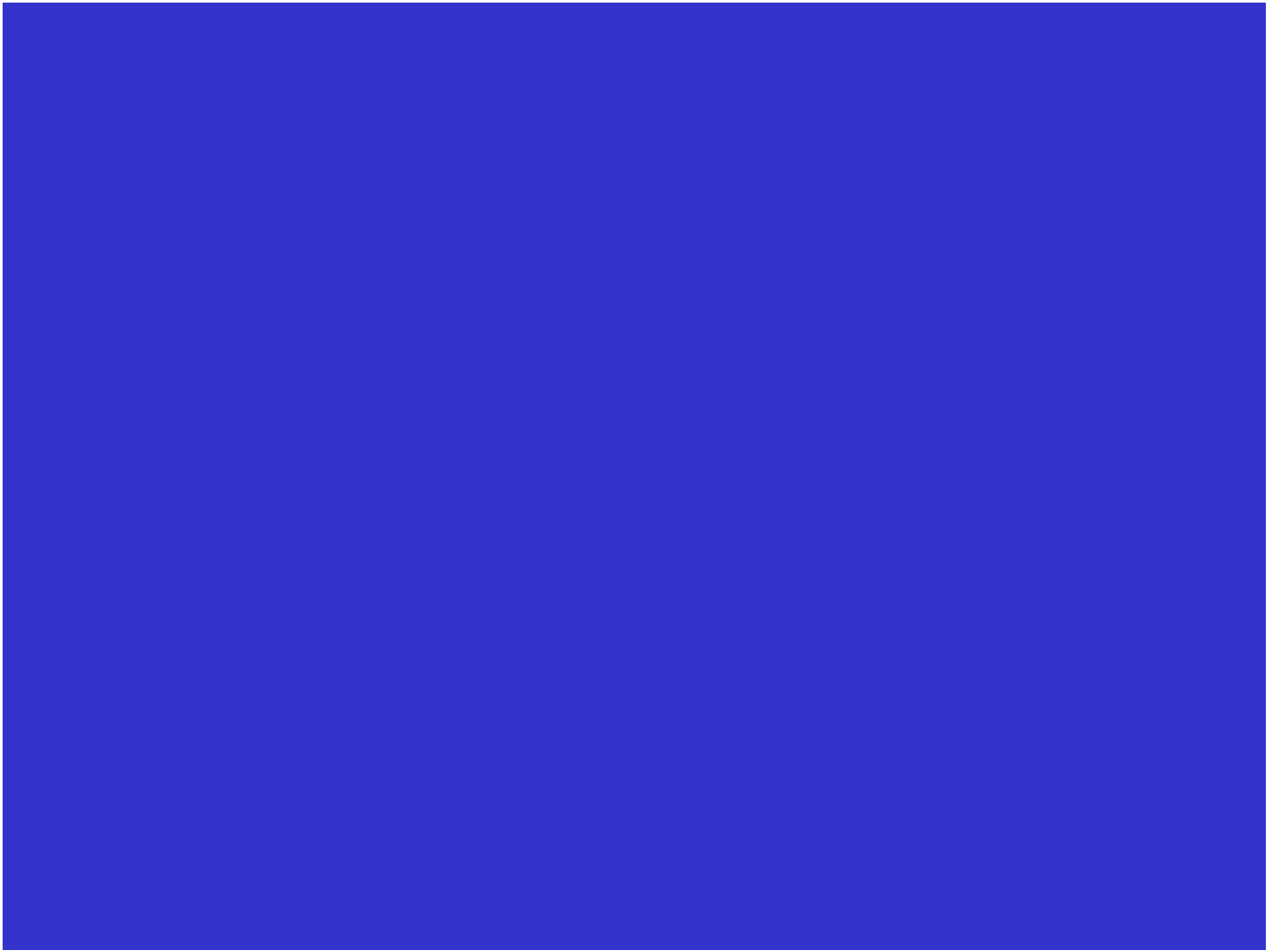
- De très nombreuses protéines peuvent être, et ont été, clonées in vivo dans de très nombreuses lignées cellulaires
- Leur fluorescence permet ainsi d'observer leur localisation, mesurer leur nombre, suivre leur mouvement et leur réactivité
- On peut aussi les photo-détruire et en étudier les conséquences

Protéines fluorescentes et génie génétique

- Il s'agit d'une **révolution** considérable pour la **recherche en biologie cellulaire**, datant d'à peine plus de 20 ans

Protéines fluorescentes et génie génétique

- cf conférence passée D. Bourgeois 16-06-2015
« Microscopie de fluorescence, super résolution, sujet du prix Nobel de Chimie 2014 »
- cf conférence à venir D. Falconet 2-02-2016
« Utilisation de la lumière pour déchiffrer les architectures du vivant »



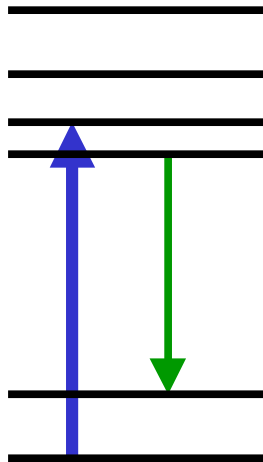
Imageries microscopiques par balayage laser de l'objet

Microscopie de fluorescence par balayage laser

- Très souvent lampe d'excitation est remplacée par un laser
 - imagerie plein champ si faisceau défocalisé
 - ou au contraire image point par point obtenue en balayant le faisceau focalisé sur l'objet étudié.
 - -> simple photodétecteur plutôt que caméra
 - -> montage **confocal** pour limiter profondeur de champ

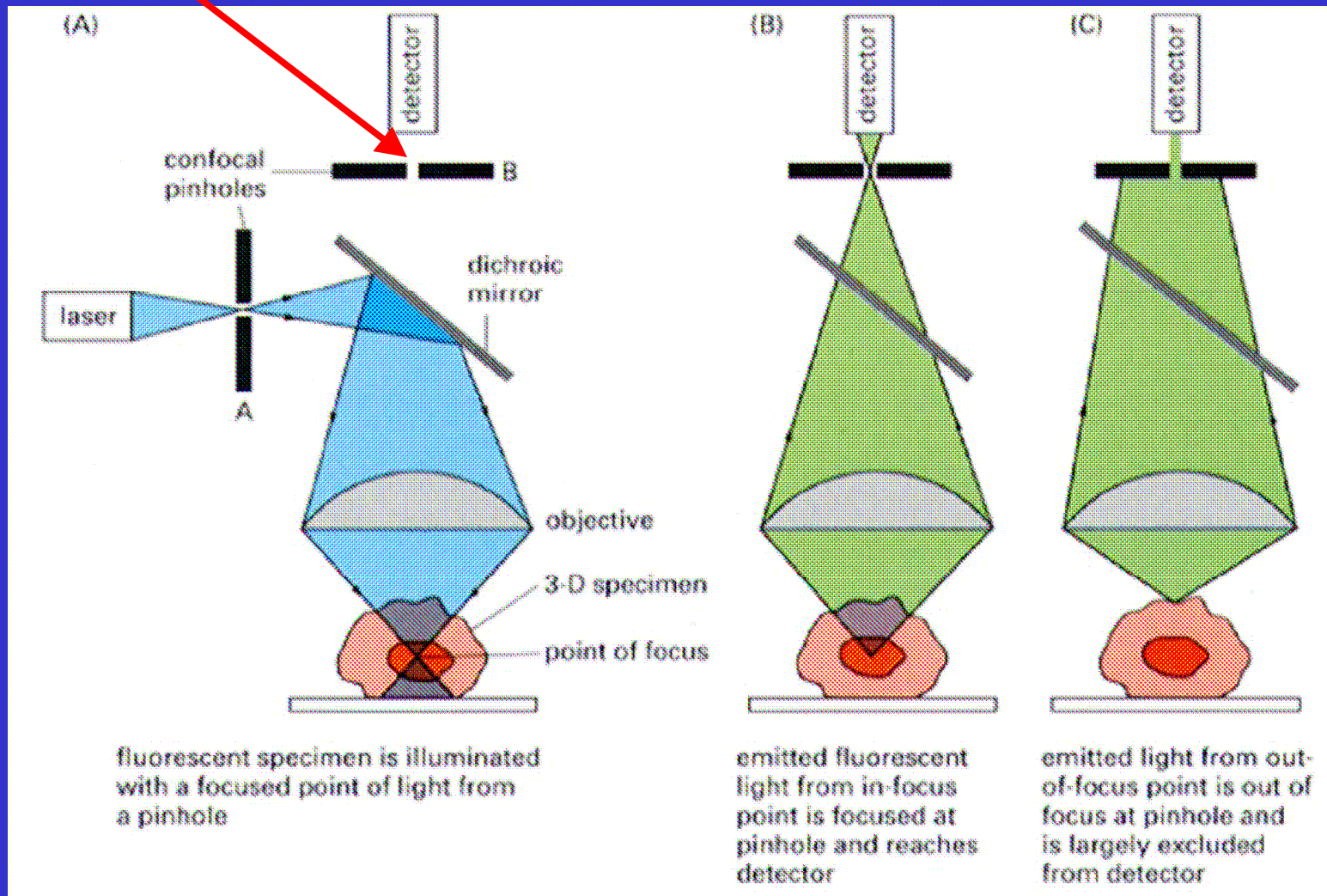
Fluorescence
excitée par
absorption
d'1 photon

Objectif



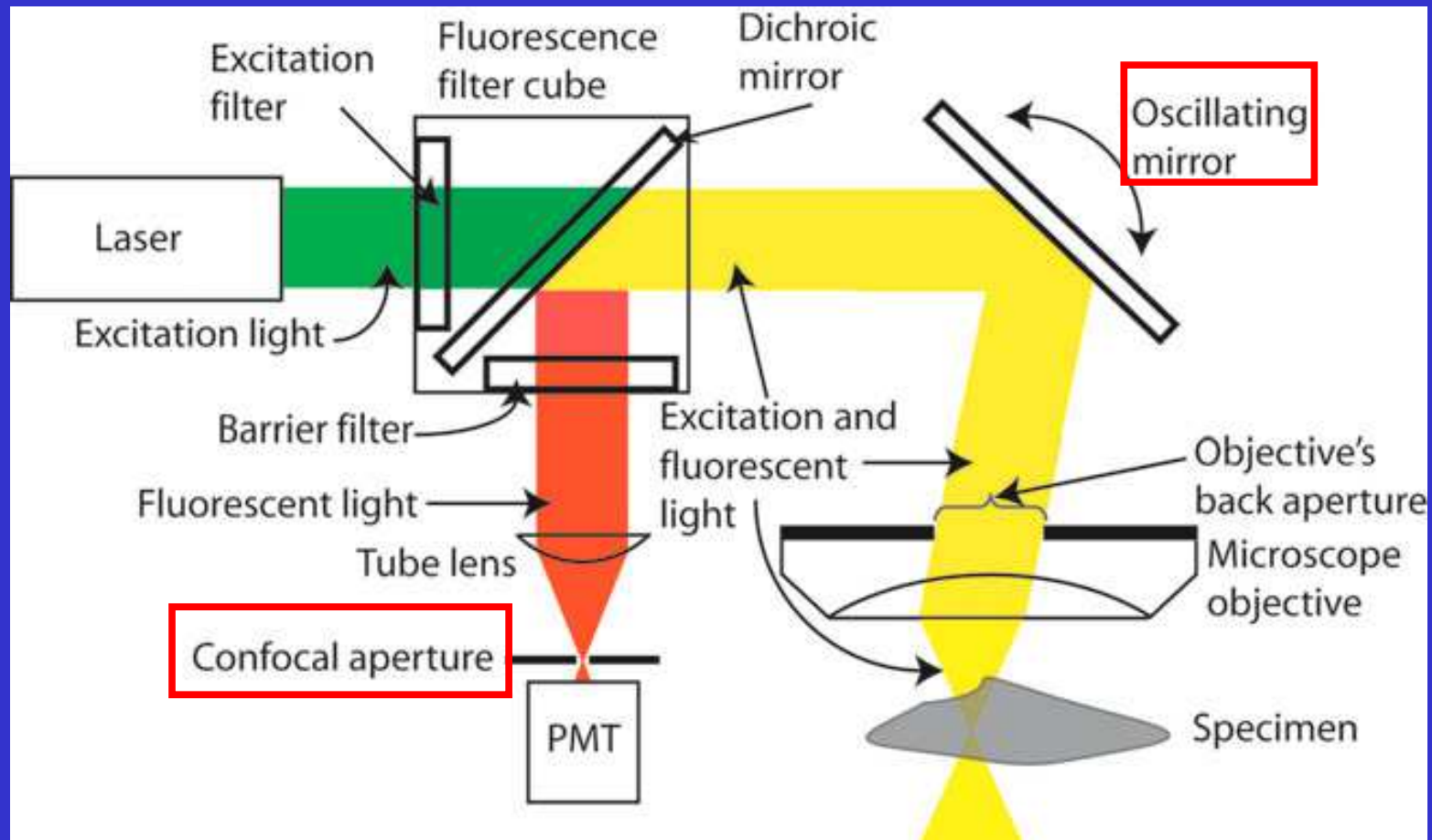
Microscopie confocale:

trou de filtrage placé devant photodétecteur



Microscopie confocale:

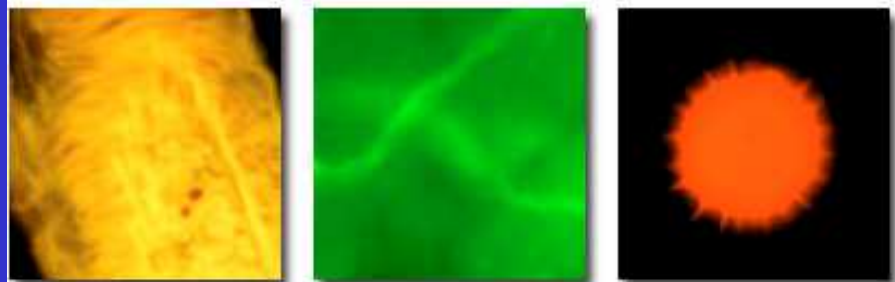
trou de filtrage placé devant photodétecteur
+ miroir mobile pour balayer le faisceau



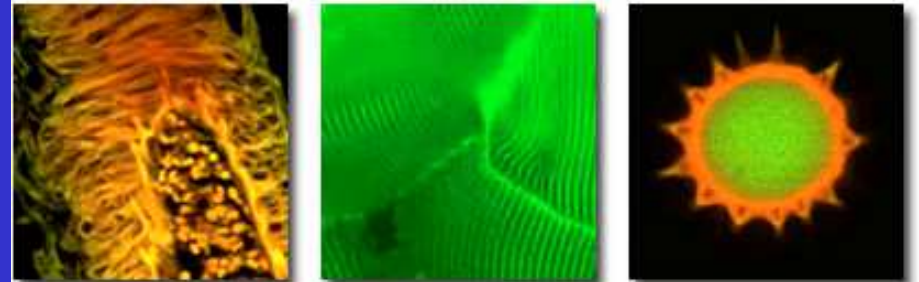
Conchello et Lichtman 2005

Résolution longitudinale de l'image: meilleure qu'avec une image éclairée plein champ

Plein champ

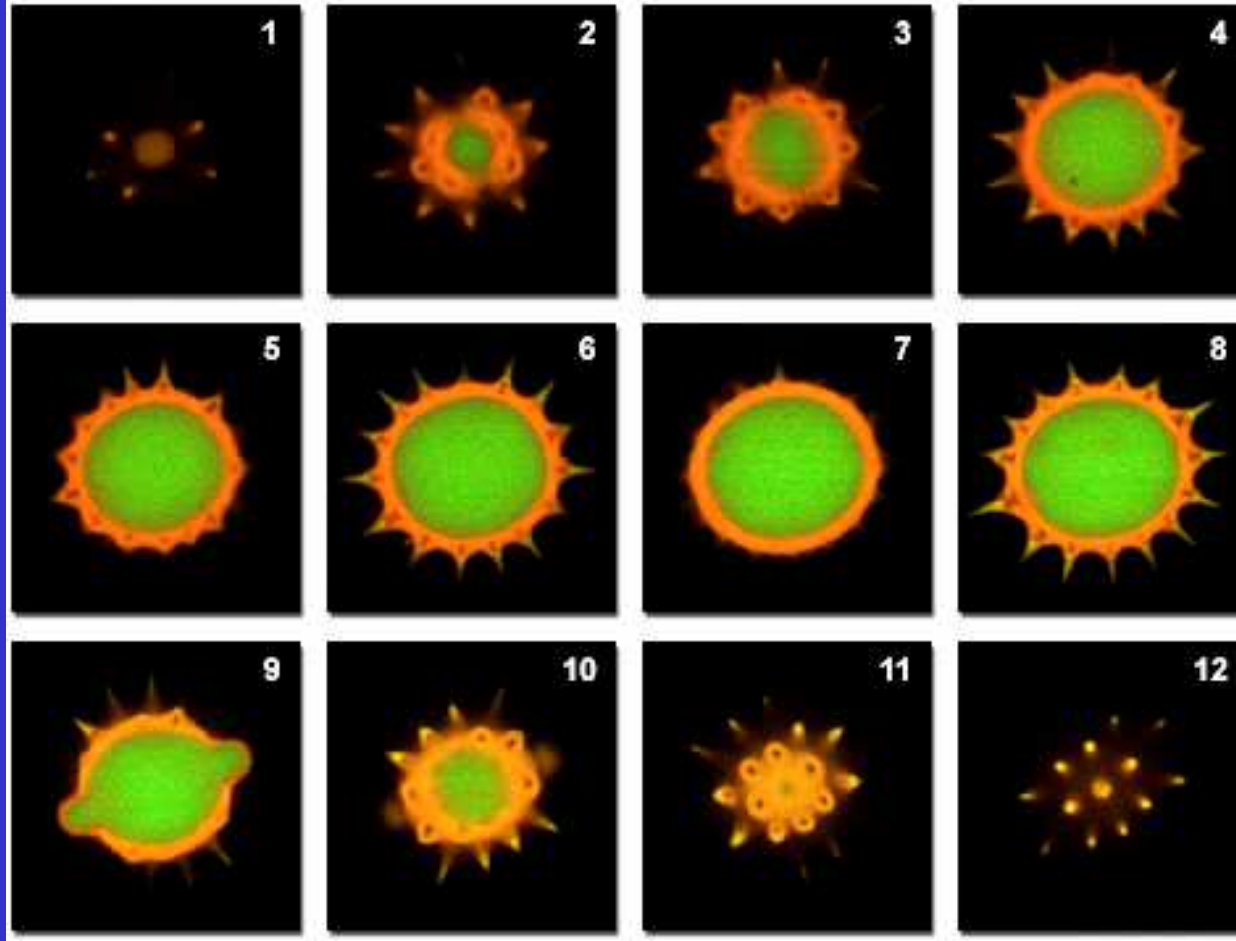


Confocal

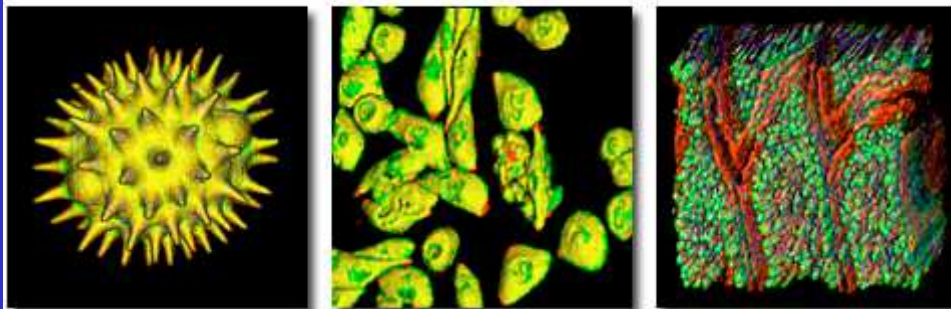


Application à l'imagerie 3D
par « section optique »

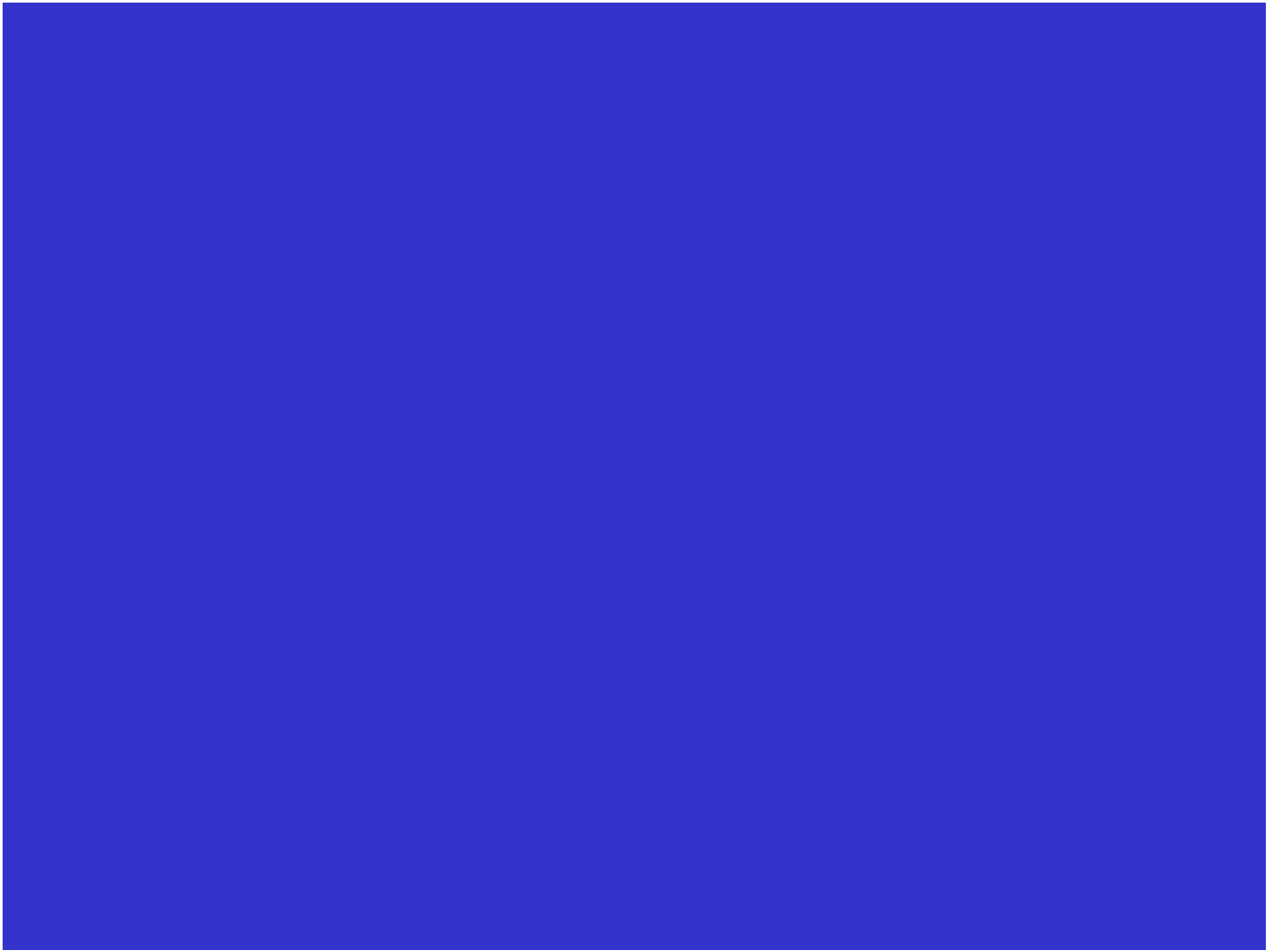
Pollen Grain Serial Optical Sections by Confocal Microscopy



Three-Dimensional Volume Renders from Confocal Optical Sections



Reconstitution 3D



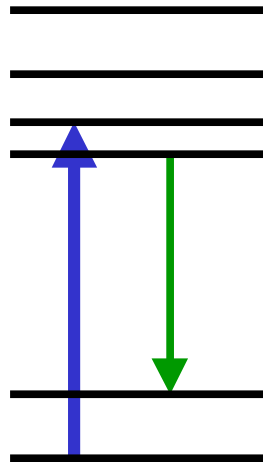
Microscopie de fluorescence « bi-photonique » et autres techniques « non linéaires »

- cf conférence passée B. Boulanger 17-11-2015
« Comment la lumière joue avec la matière ? Avec
l'optique non linéaire ! »

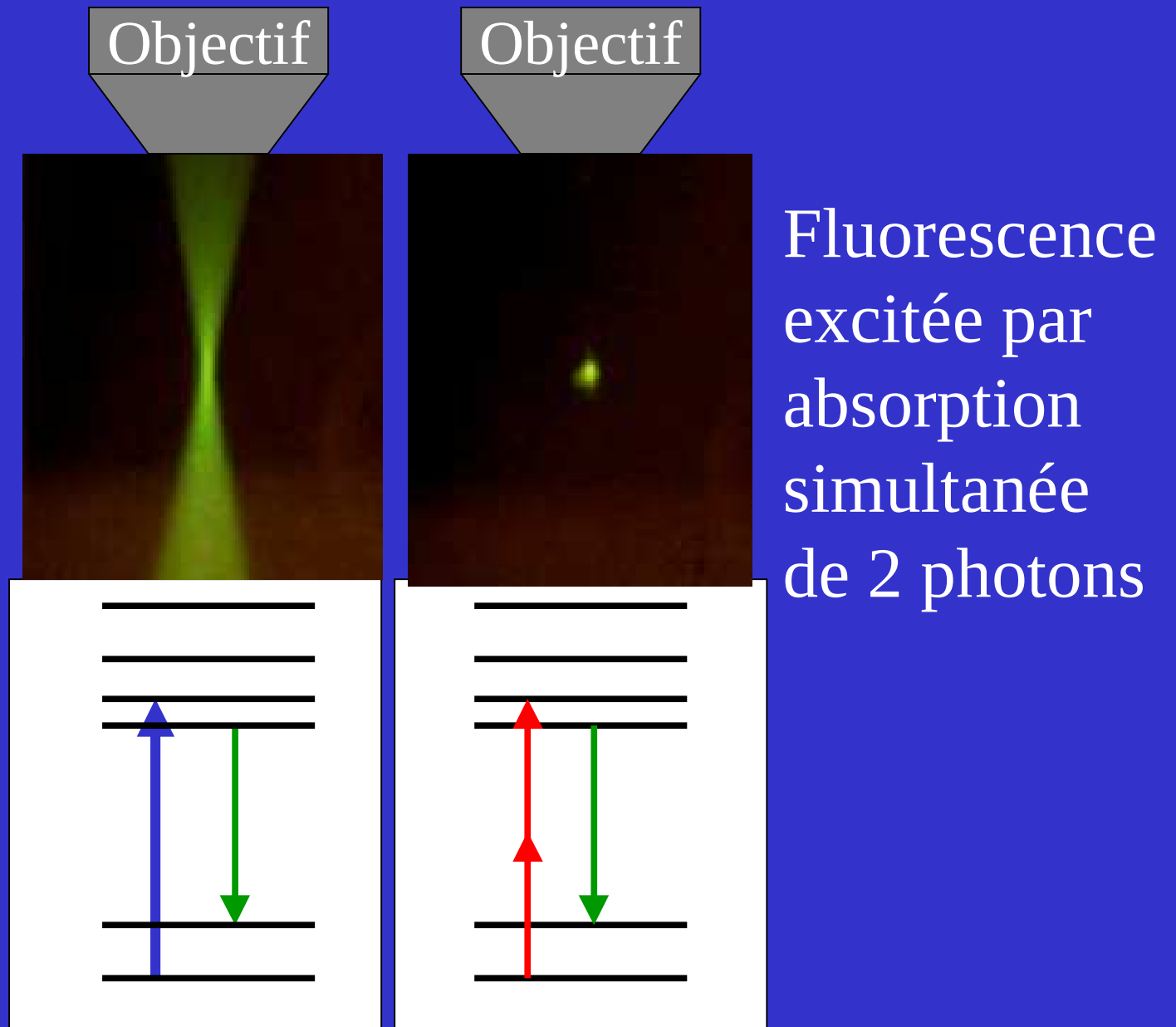
Microscopie bi-photonique

Fluorescence
excitée par
absorption
d'1 photon

Objectif



Microscopie bi-photonique



Microscopie bi-photonique

- Profondeur de champ automatiquement limitée

- Evite les phénomènes de **photo-blanchiment**

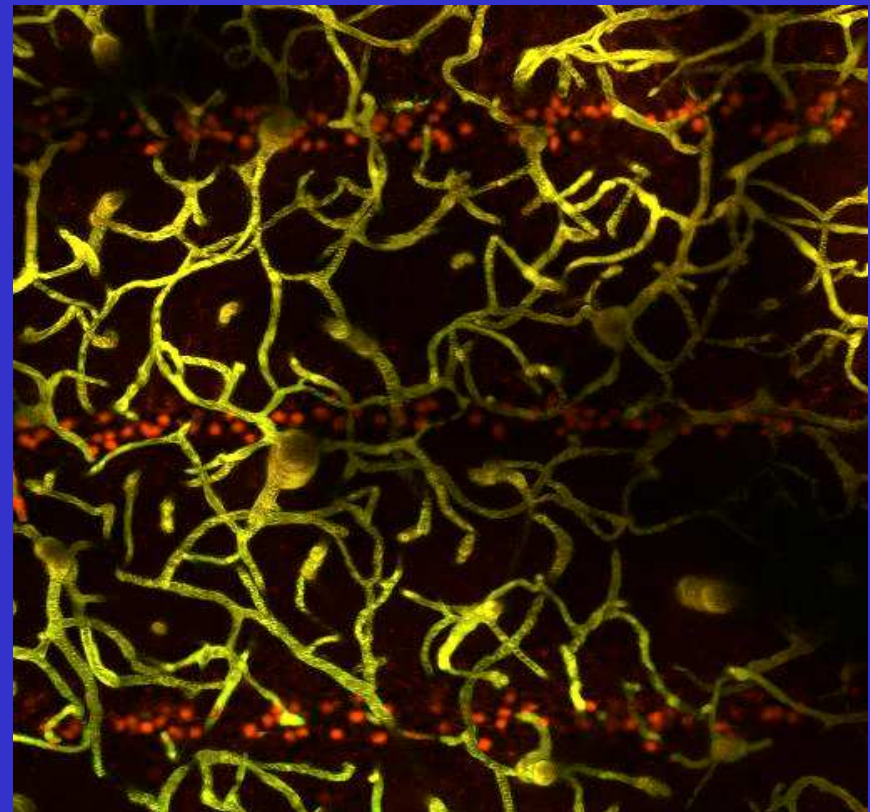
- Meilleure pénétration du rayonnement d'excitation dans le milieu



Fluorescence excitée par absorption simultanée de 2 photons

Microscopie bi-photonique

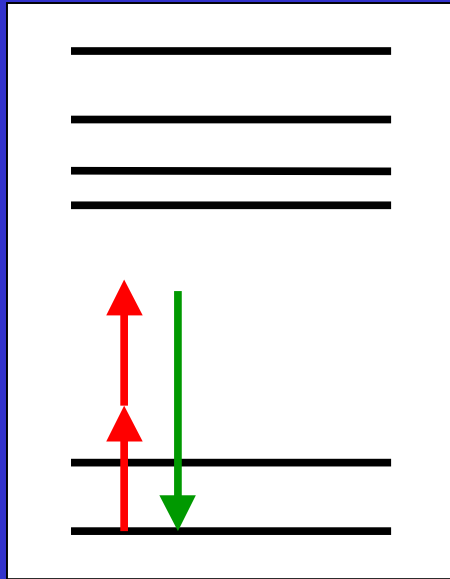
Exemple d'application: imagerie de la microvascularisation du cerveau d'une souris



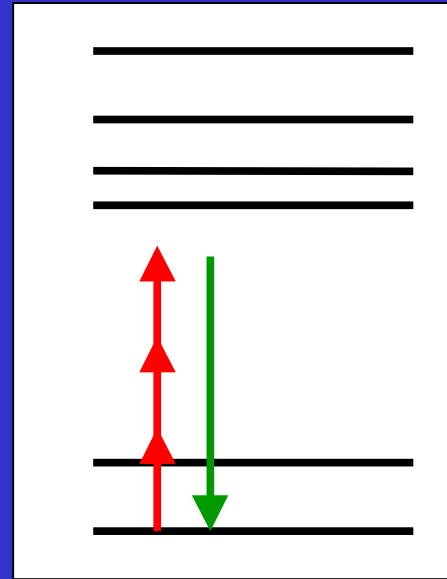
- J.C. Vial, P.Vérant
LIPhy,
UJF-CNRS
- J. Coles *et al.*
GIN, UJF-INSERM

Jaune: fluorescence d'un colorant injecté dans le sang

Microscopies optiques non linéaires



Génération
d'harmonique 2

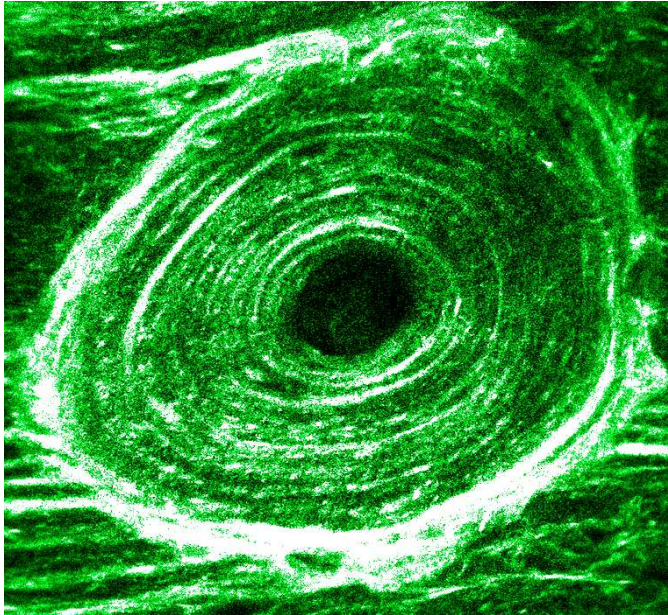


Génération
d'harmonique 3

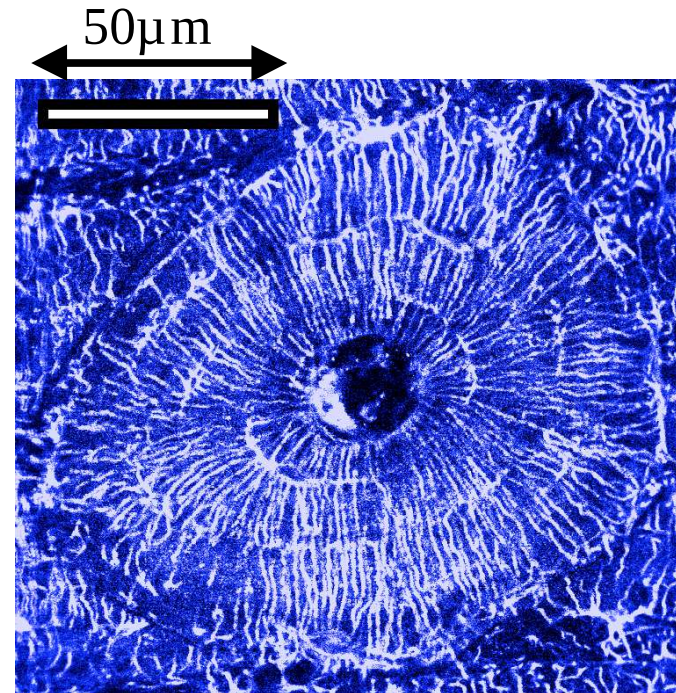
Processus **non résonnants** sensibles à la structure
de la matière au voisinage du point focal

Imagerie morphologique **sans marquage!**

Microscopie optique non linéaire



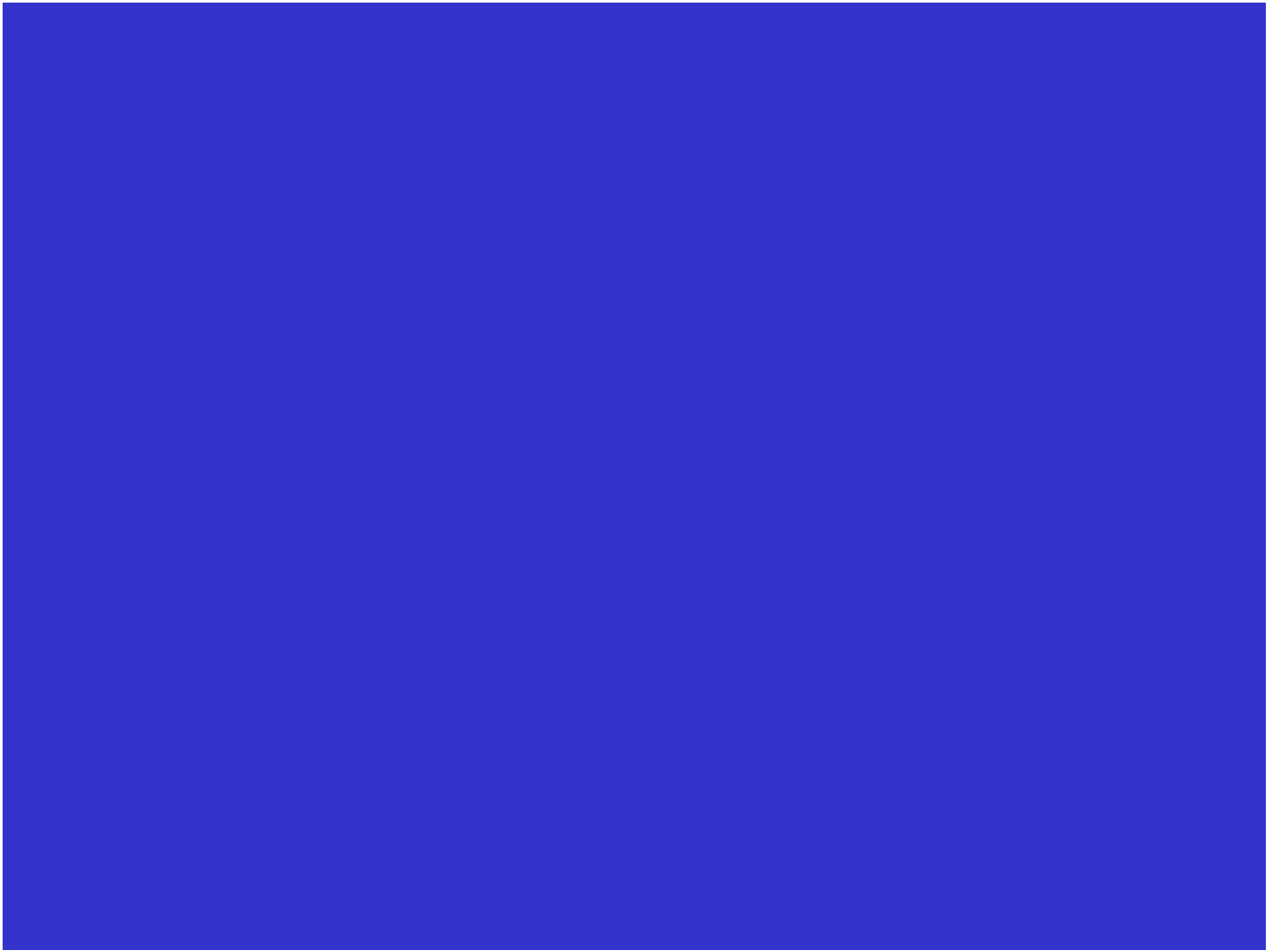
Génération
d'harmonique 2



Génération
d'harmonique 3

Images d'une section de fémur de bovin

R. Genthial, D. Débarre, A. Gourrier (LIPhy),
E. Beaupaire *et al* (Polytechnique) 2015



Optique « adaptative » en microscopie

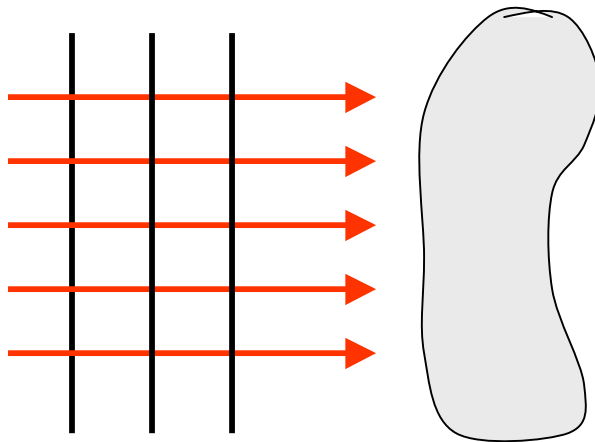
Optique « adaptative » en microscopie



Image crédit J. Kubby,
W.M. Keck Center for
Adaptive Optical
Microscopy, Univ.
California Santa Cruz

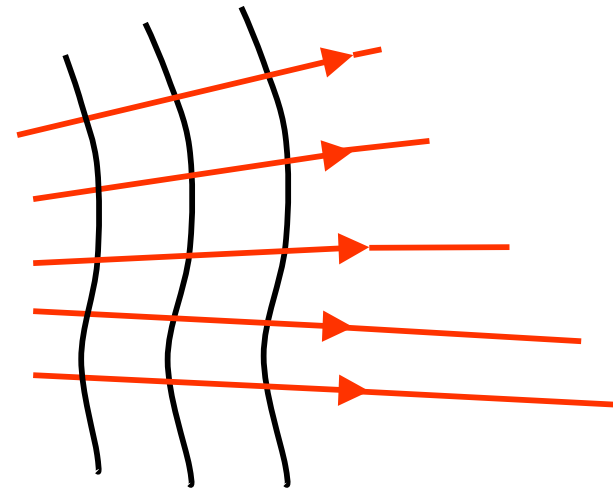
Image floue d'un objet vu à travers
un milieu transparent inhomogène

Optique « adaptative »



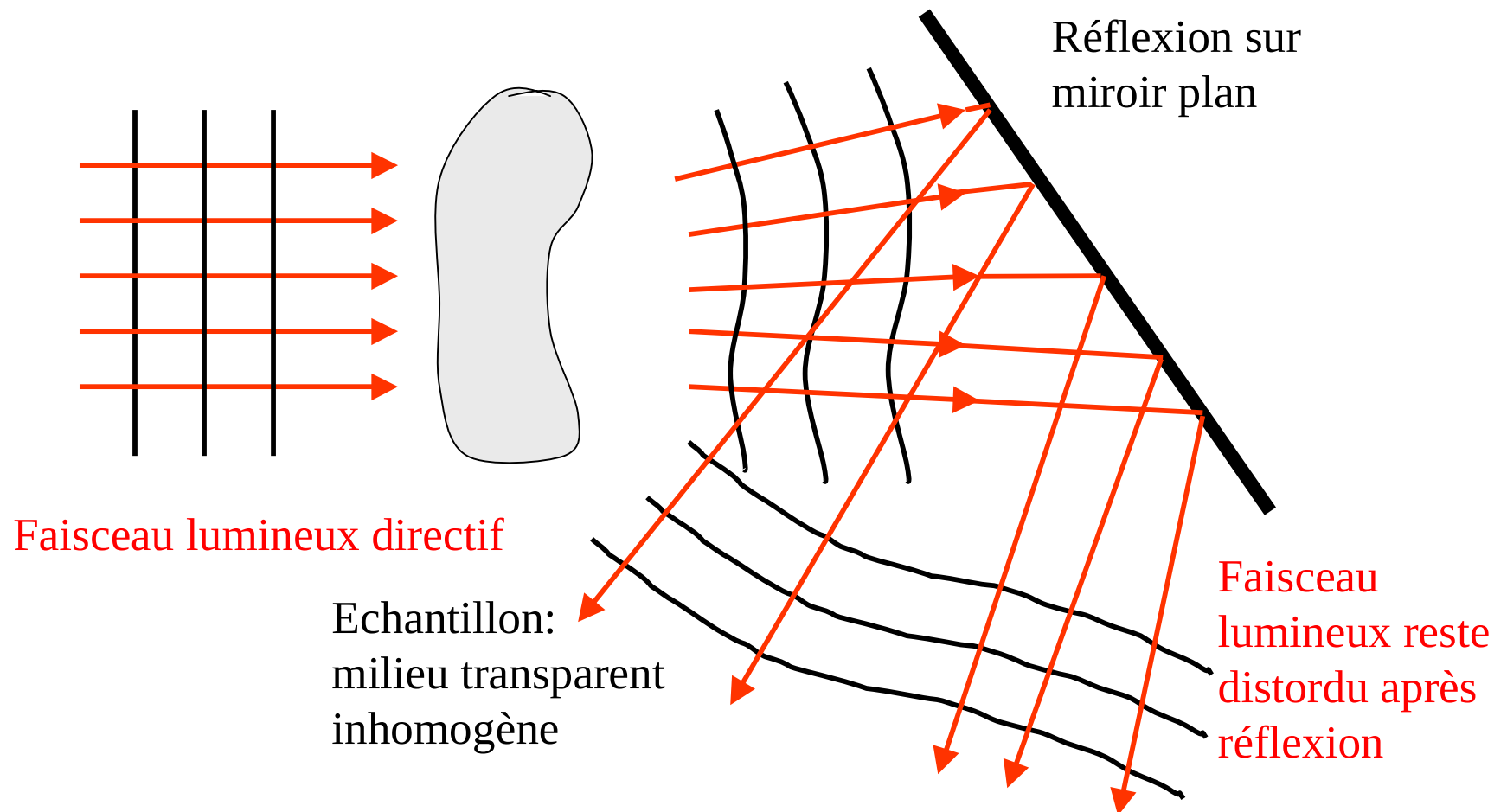
Faisceau lumineux directif

Echantillon:
milieu transparent
inhomogène

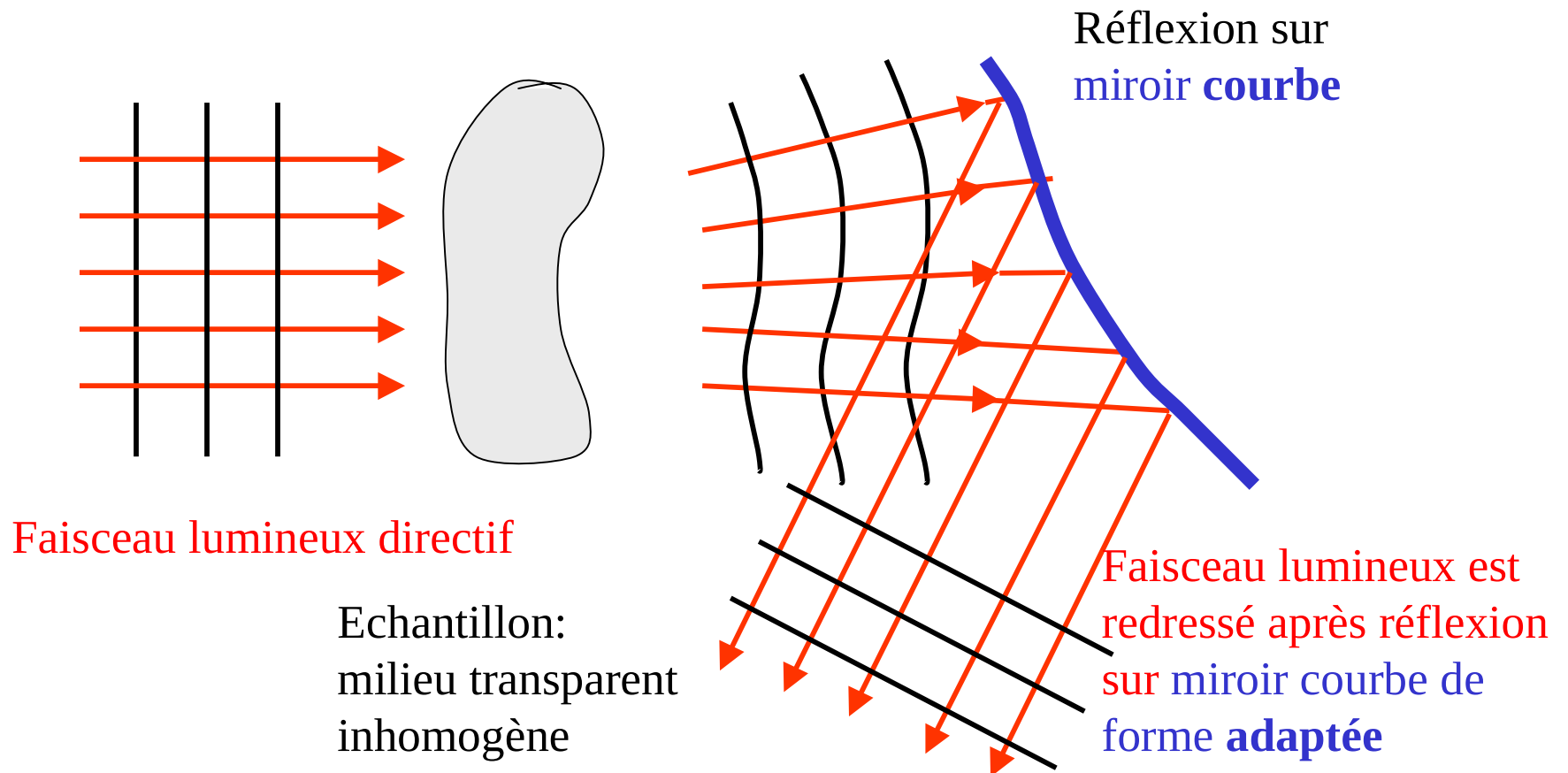


Faisceau lumineux
distordu après traversée
de l'échantillon

Optique « adaptative »

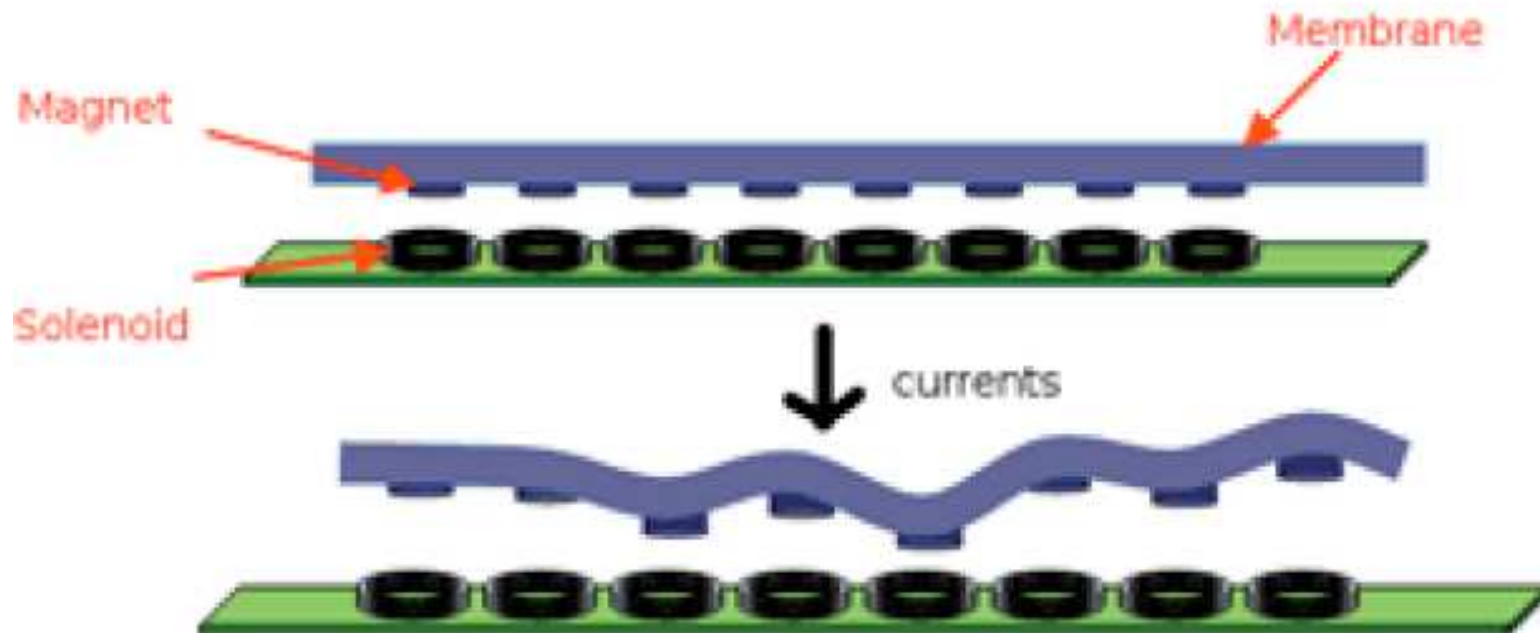


Optique « adaptative »



Miroirs déformables:

cf Société ALPAO (Montbonnot)



Optique adaptative en microscopie

- Utile pour observation en profondeur d'échantillons « épais »
- méthodes pour « adapter » la forme du miroir déformable
 - méthode 1: analyse de la lumière émise par un point source inséré dans l'échantillon
 - méthode 2: algorithme d'optimisation d'un critère de qualité de l'image observée

Optique adaptative en microscopie

- Exemple: Imagerie 3D par microscopie de fluorescence biphotonique + optique adaptative du cerveau d'un embryon *vivant* de poisson-zèbre génétiquement modifié/protéine fluo jaune

Prix Nobel de chimie 2014

Wang, Milkie, Saxena, Engerer, Misgeld,
Bronner, Mumm, **Betzig**; Nature Methods,
11, 625-628 (2014)

Conclusion

- Microscopie optique outil puissant pour étude d'objets biologiques
 - morphologie
 - imagerie moléculaire, sonde du fonctionnement des cellules

Conclusion

- Nombreux développements instrumentaux et méthodologiques en cours
 - détecteurs, sources de lumière, optiques, systèmes d'acquisition
 - correction d'aberrations optiques par « optique adaptative »
 - interaction lumière-matière, photophysique moléculaire

Conclusion

- Importance fondamentale des marqueurs moléculaires
 - chimie
 - biochimie
 - génie génétique