

Microscopie non linéaire multimodale (2PEF, SHG, THG) pour l'imagerie de tissus intacts

Emmanuel Beaupaire*, Delphine Débarre, Nicolas Olivier, Ana-Maria Pena, Willy Supatto, Jean-Louis Martin, Mathias Strupler, Marie-Claire Schanne-Klein

Laboratoire d'optique et biosciences, Ecole Polytechnique, CNRS, INSERM, 91128 Palaiseau

Résumé – La microscopie non linéaire permet d'observer des milieux complexes avec une résolution tridimensionnelle micrométrique. Outre la fluorescence excitée à deux photons (2PEF) qui est aujourd'hui largement utilisée pour l'imagerie de tissus biologiques, d'autres formes de contraste sont exploitables. Par exemple, la génération de second (SHG) ou troisième harmonique (THG) fournissent des informations complémentaires à la fluorescence en détectant spécifiquement certaines structures capables de produire ce type d'émission cohérente. Nous présentons les principes de ces approches, et plusieurs applications récentes.

1. Microscopie non linéaire

Depuis son introduction en 1990, la microscopie de fluorescence excitée à deux photons (2PEF) s'est imposée comme une méthode incontournable d'imagerie de tissus intacts à l'échelle sub-cellulaire[1]. En effet, la caractéristique la plus remarquable de la microscopie multiphotonique est de maintenir une résolution tridimensionnelle micrométrique lors de l'observation en profondeur d'un milieu diffusant[2]. Combinée aux technologies de protéines-fusion (GFP etc), cette approche est aujourd'hui utilisée dans de nombreux domaines, notamment en neurophysiologie. Un autre attrait de ce type d'imagerie réside dans la possibilité d'utiliser d'autres phénomènes optiques non linéaires comme source de contraste (figure 1). Ainsi, les microscopies par génération de second harmonique (SHG) et par génération de troisième harmonique (THG) permettent également d'observer des milieux complexes, et fournissent des informations complémentaires par rapport à l'imagerie de fluorescence. L'étude en cours des mécanismes de contraste de ces formes alternatives de microscopie non linéaire a mené récemment au développement de nouvelles applications.

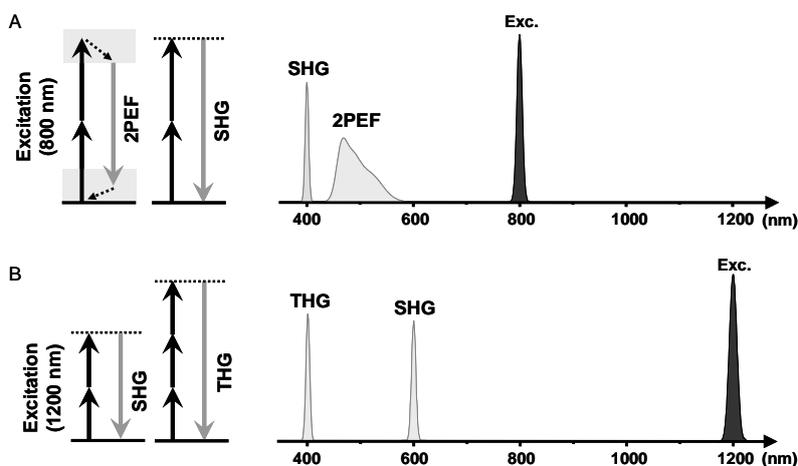


Figure 1. Mécanismes de la fluorescence excitée à deux photons (2PEF), de la génération de second (SHG) et troisième (THG) harmoniques. (A) Exemple 1 : échantillon excité à 800 nm, produisant un signal SHG à 400 nm et un signal 2PEF à 450-580 nm. (B) Exemple 2 : échantillon excité à 1200 nm, produisant un signal THG à 400 nm et un signal SHG à 600 nm.

2. Génération de second (SHG) et troisième harmonique (THG) par des structures biologiques

La génération d'harmonique est un phénomène cohérent: les ondes rayonnées par différentes molécules présentes dans le volume d'excitation peuvent interférer de façon constructive ou destructive selon la répartition spatiale de ces molécules. De ce fait, les microscopies SHG et THG sont sensibles à certaines géométries à l'échelle du volume sondé. En particulier, un signal SHG ne peut être obtenu que dans un milieu non centrosymétrique ; la microscopie SHG est donc sensible à la symétrie à l'échelle du volume focal. En revanche, la génération de troisième harmonique n'impose pas de contrainte de symétrie ; cependant aucun signal THG ne peut être obtenu dans un milieu homogène normalement dispersif. Cette propriété résulte de l'inversion de phase présente au voisinage du foyer d'un faisceau focalisé. Un signal est par contre obtenu lorsqu'une hétérogénéité est présente au foyer de l'objectif, par exemple une interface entre deux milieux optiquement distincts (eau et lipides, par exemple).

* emmanuel.beaupaire@polytechnique.edu - Tel : 01 69 33 50 21 - <http://www.lob.polytechnique.edu>

Certaines structures cellulaires ou tissulaires permettent de réaliser les conditions d'efficacité, de symétrie et d'accord de phase appropriées, et fournissent naturellement ces types de réponse[3,4]. Dans ce cas, l'émission se fait en général dans la direction du faisceau excitateur, et peut être séparée spectralement de la fluorescence et détectée indépendamment (voir figure 1). La microscopie SHG permet de visualiser certaines structures macromoléculaires denses et organisées telles que les fibres de collagène, les myofilaments ou les faisceaux de microtubules[3,5], et permet notamment l'étude des fibres collagéniques [6,7]. La microscopie THG détecte les interfaces ou les inclusions micrométriques [8] telles que les gouttelettes lipidiques[9,10], et permet de visualiser sans marquage le développement embryonnaire de petits organismes [11,12] (figure 2). Enfin, ces approches se combinent naturellement avec les techniques de photoablation en régime femtoseconde, permettant de réaliser des micro-lésions tridimensionnelles dans les cellules et tissus observés[12].

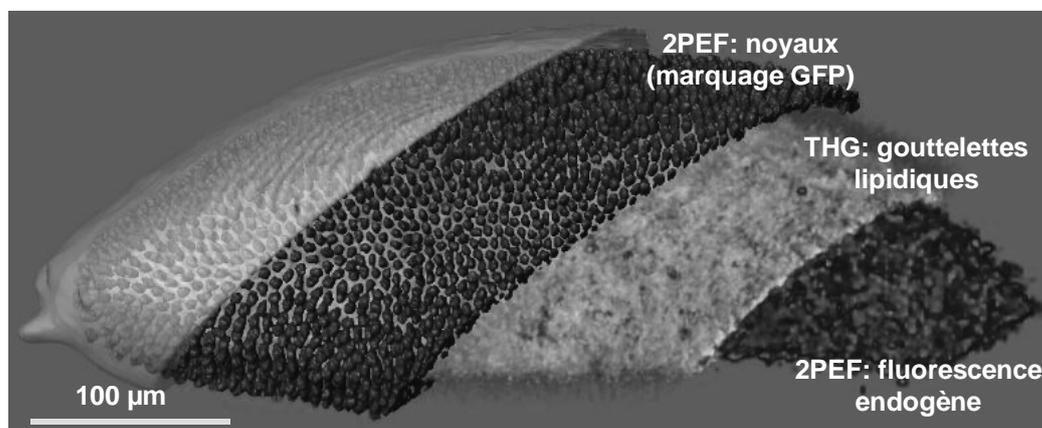


Figure 2. Imagerie combinée 2PEF/THG d'un embryon de drosophile avant la phase de gastrulation, comportant un marquage GFP dans les noyaux localisés à la périphérie de l'embryon. L'image illustre la forte densité de structures lipidiques (détectées en THG) présentes entre les noyaux et les structures internes (vitellus) [9].

3. Références

- [1] W. Zipfel et al, *Nonlinear magic: multiphoton microscopy in the biosciences*, Nat. Biotechnol. **21** (2003) 1369.
- [2] F. Helmchen & W. Denk, *Deep tissue two-photon microscopy*, Nature Methods **2** (2005), 932-940.
- [3] W. Zipfel et al, *Live tissue intrinsic emission microscopy using multiphoton excited intrinsic fluorescence and second-harmonic generation*, PNAS **100** (2003), 7075-80.
- [4] D. Débarre et al, *Microscopies multi-harmoniques pour l'imagerie structurale de tissus intacts*, Médecine Sciences **22** (2006) 845-50.
- [5] P. Campagnola & L. Loew, *Second-harmonic imaging microscopy for visualizing biomolecular arrays in cells, tissues and organisms*, Nature Biotechnol. **21** (2003) 1356-60.
- [6] M. Strupler et al, *Second harmonic imaging and scoring of collagen in fibrotic tissues*, Opt. Express **15** (2007) 4054-4065.
- [7] A.-M. Pena et al, *Three-dimensional investigation and scoring of extracellular matrix remodeling during lung fibrosis using multiphoton microscopy*, Microsc. Res. Techn. **70** (2007), 162.
- [8] D. Oron et al, *Depth-resolved structural imaging by THG microscopy*, J. Struct. Biol. **147** (2004) 3-11.
- [9] D. Débarre et al, *Imaging lipid bodies in cells and tissues using third-harmonic generation microscopy*, Nature Methods **3** (2006) 47-53.
- [10] D. Débarre & E. Beaurepaire, *Quantitative characterization of biological liquids for third-harmonic generation microscopy*, Biophys. J. **92** (2007) 603-612.
- [11] D. Débarre et al, *Velocimetric third-harmonic generation microscopy: micrometer-scale quantification of morphogenetic movements in unstained embryos*, Opt. Lett. **29** (2004), 2881-2883.
- [12] W. Supatto et al, *In vivo modulation of morphogenetic movements in Drosophila embryos with femtosecond laser pulses*, PNAS **102** (2005) 1047-1052.