

Du Microscope au Nanoscope ?

Développements récents en microscopie optique 3D

Olivier Haeberlé

Laboratoire MIPS-EA2332, Université de Haute-Alsace Mulhouse
IUT de Mulhouse, 61 rue Albert Camus, 68093 Mulhouse Cédex

Résumé: Le microscope optique est devenu un instrument de référence en biologie, grâce à ses possibilités uniques d'observation en 3D de spécimens vivants, marques spécifiquement si nécessaire (fluorescence). Comparé à d'autres techniques (microscopie électronique, en champ proche), sa résolution reste cependant limitée, ce qui a motivé de nombreux travaux visant à améliorer cet instrument. Plusieurs techniques permettent maintenant de dépasser la classique limite d'Abbe, et ouvrent la voie à une imagerie optique en champ lointain avec une résolution nanométrique et non plus micronique ou submicronique.

1. Introduction

La microscopie optique s'est imposée comme la technique de référence pour la compréhension des mécanismes cellulaires, de par ses possibilités uniques d'imager en 3 dimensions des spécimens vivants, éventuellement sur de longues périodes. La plus grande limitation du microscope optique (en comparaison à la microscopie électronique à balayage par exemple) est sa résolution limitée.

Parmi les différentes techniques de microscopie optique, la microscopie de fluorescence occupe une place à part. En effet, l'utilisation de fluorophores spécifiques permet le marquage de structures cellulaires, et donc l'étude des fonctions biologiques associées. Diverses méthodes ont été proposées pour améliorer la résolution. Certaines, comme les microscopies 4Pi et STED sont déjà développées industriellement.

Pour les spécimens non-marqués, les techniques de microscopies en transmission s'imposent (grand-champ, contraste de phase...). Le contraste enregistré fait intervenir de manière complexe les caractéristiques optiques du spécimen, et il est difficile de l'interpréter en termes de grandeurs physiques. La technique de microscopie tomographique diffractive, inspirée des techniques de synthèse d'ouverture en astronomie, permet de dépasser la classique limite d'Abbe et mais aussi la mesure de la distribution des indices optiques à travers le spécimen.

2. Microscopie de Fluorescence

Les deux types de microscopes de fluorescence les plus courants sont le microscope grand champ et le microscope confocal. Une explication simple de la meilleure résolution spatiale en microscopie confocale peut être donnée par une interprétation probabilistique du processus de détection. Dans un microscope classique, la probabilité pour un photon d'arriver au détecteur est donnée par le produit de la probabilité spatiale de création du photon de fluorescence (égale à 1 car l'excitation est uniforme) par la probabilité de détection spatiale P_d de ce photon. Cette probabilité spatiale de détection P_d est donnée par la tache de diffraction 3D, ou tache d'Airy.

Dans un microscope confocal, la probabilité d'excitation P_f est aussi en première approximation décrite par la tache d'Airy due à la focalisation du laser d'excitation par l'objectif et donc la Réponse Impulsionnelle Optique (RIO) d'un microscope confocal est en première approximation simplement obtenue en élevant au carré la RIO d'un microscope classique. Avec cette interprétation, on comprend que n'importe quel mécanisme capable de réduire le volume d'émission de fluorescence diminuera le volume de la RIO globale.

Le phénomène de focalisation permet d'obtenir un spot d'excitation de dimensions $\sim \lambda/2$ latéralement et $\sim \lambda$ longitudinalement. Le phénomène d'interférence conduit lui à des franges dont la largeur à mi-hauteur vaut $\sim \lambda/4$. La microscopie 4Pi [1] utilise ce phénomène pour diminuer la RIO d'excitation, en faisant interférer longitudinalement 2 faisceaux d'illumination coaxiaux (Fig. 1(a)). On peut le combiner avec une détection confocale, mais on peut aussi réaliser la détection de fluorescence de manière cohérente à travers les 2 objectifs dans une configuration de microscope 4Pi de type C. La résolution latérale reste celle d'un microscope confocal, mais la résolution longitudinale descend sous les 100 nm.

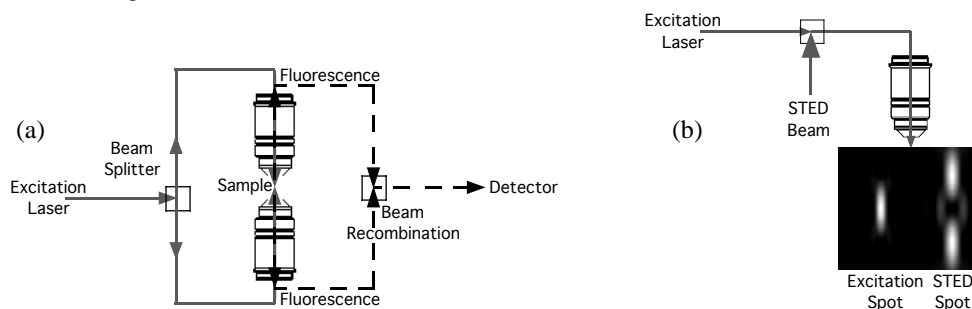


Figure 1 : Principe des microscopes 4Pi (a) et STED (b)

Le microscope STED [2] utilise le phénomène d'émission stimulée pour diminuer la zone d'émission de fluorescence spontanée. C'est essentiellement un microscope confocal modifié. Dans un premier temps, l'excitation est produite par un faisceau focalisé en régime femtoseconde/picoseconde (Fig. 1(b)). Le faisceau STED, proprement mis en forme, provoque alors l'émission *stimulée* à la périphérie du spot d'excitation. Ce rayonnement est filtré en longueur d'onde. La zone permettant l'émission *spontanée* en fluorescence est alors grandement réduite. Cette technique a démontré une résolution spatiale 3D meilleure que 100 nm, et de l'ordre de 50 nm en 2D, dans des spécimens biologiques.

3. Microscopie Tomographique Diffractive

La microscopie tomographique diffractive est une technique d'imagerie 3D basée sur la microscopie holographique en lumière cohérente et l'interférométrie, combinée avec un balayage angulaire (tomographie), le spécimen observé étant successivement illuminé par une série d'ondes planes cohérentes dont l'angle d'incidence varie [3].

Pour chaque incidence, l'onde diffractée par l'objet est enregistrée dans l'espace de Fourier au moyen d'un interféromètre à décalage de phase et d'une caméra CCD. Chaque jeu d'hologrammes en décalage de phase permet de mesurer un front d'onde diffractée, en amplitude et en phase. La difficulté principale est de recalibrer les différents fronts mesurés entre eux [4]. Cette technique se rapproche donc des techniques de synthèse d'ouverture utilisée en astronomie ou en imagerie radar. Les enregistrements successifs permettent alors de reconstruire le spectre de l'onde diffractée par le spécimen.

Dans le cadre de la première approximation de Born [3] (objets faiblement absorbant/diffusant et peu épais pour lequel il n'y a pas de diffraction multiple), on considère que cette onde diffractée est l'image dans l'espace de Fourier 3D de la distribution des indices dans le spécimen. On obtient donc directement une image tridimensionnelle dans l'espace objet par une FFT 3D, image qui correspond donc à la distribution spatiale de l'indice optique dans le spécimen, une donnée physique qui n'était jusqu'alors pas ou difficilement accessible. L'utilisation d'un éclairage cohérent permet de plus une meilleure résolution.

Dans les configurations les plus courantes, la détection de l'onde diffractée ne se fait qu'en transmission. De ce fait, cette technique souffre aussi de la présence d'un "missing cone" nuisible à la résolution en z. Une variante consiste à faire tourner le spécimen sur lui-même, en gardant l'incidence d'illumination fixe. On peut aussi détecter l'onde diffractée en transmission *et* en rétropropagation [4], dans un montage similaire au microscope 4Pi, ce qui peut être avantageux pour la préparation et la manipulation du spécimen.

La Figure 2 montre une diatomée observée à l'aide cette technique. La nature lenticulaire du spécimen est clairement visible.

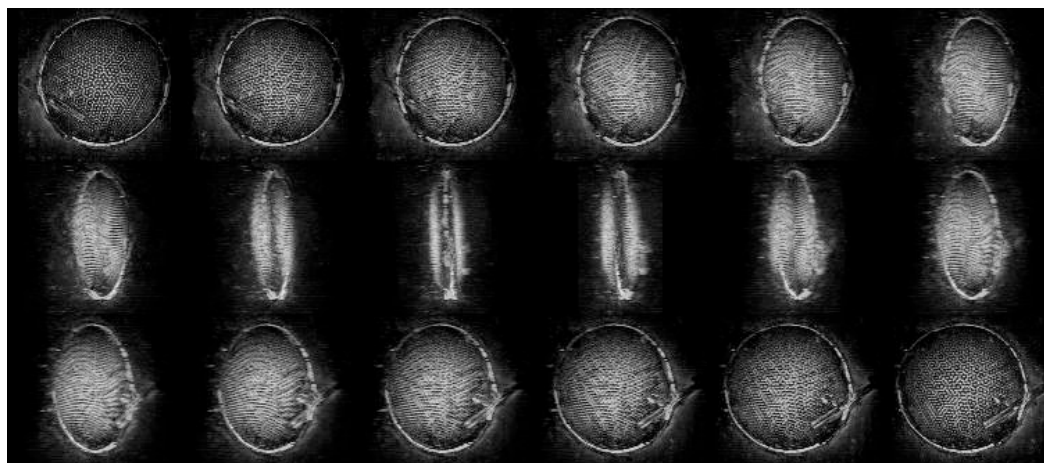


Figure 2 : Diatomée (*Coscinodiscus sp*) observée en microscopie tomographique diffractive

4. Références

- [1] S.W. Hell and E. H. K. Stelzer, *Fundamental improvement of resolution with a 4Pi-confocal fluorescence microscope using two-photon excitation*, Opt. Comm. **93**, (1992) 277-282
- [2] S.W. Hell and J. Wichmann, *Breaking the diffraction resolution limit by stimulated emission*, Opt. Lett. **19**, (1994) 780-782
- [3] E. Wolf, *Three-dimensional structure determination of semitransparent objects from holographic data*, Opt. Comm. **1**, (1969) 153-156
- [4] V. Lauer, *New approach to optical diffraction tomography yielding a vector equation of diffraction tomography and a novel tomographic microscope*, J. Microscopy **205** (2002) 165-176.