

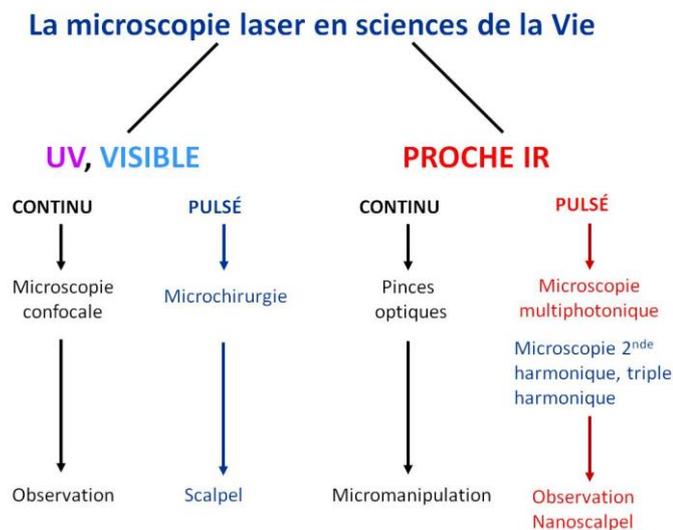
LA MICROSCOPIE MULTIPHOTONIQUE : L'IMAGERIE DANS L'INFRA-ROUGE

Philippe COCHARD Directeur de recherche CNRS
Centre de Biologie du Développement
UMR 5547 CNRS/UPS
Université Paul Sabatier
Philippe.cochard@univ-tlse3.fr

Nous avons vu que la microscopie confocale souffrait de plusieurs inconvénients :

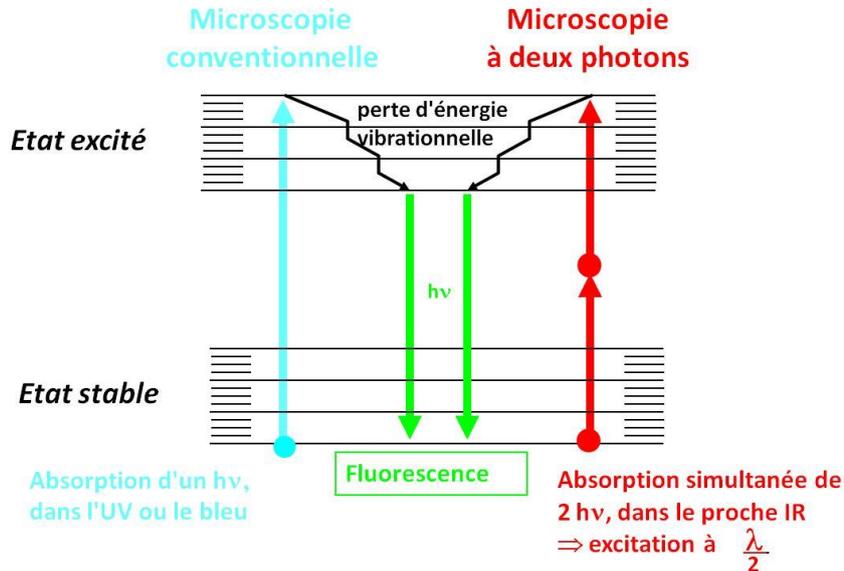
- Photo-toxicité cellulaire dans toute l'épaisseur de la préparation
- Photo-blanchiment (« bleaching ») dans toute l'épaisseur de la préparation
- Pénétration relativement réduite dans l'épaisseur de la préparation (<80µm)

L'introduction de la microscopie multiphotonique (souvent appelée « biphoton ») a permis de lever en partie ces inconvénients. Ce type de microscopie fait appel à la lumière infra-rouge. Avant de décrire le principe de la microscopie multiphotonique, le tableau suivant résume les utilisations les plus courantes de la microscopie laser en biologie et en médecine.

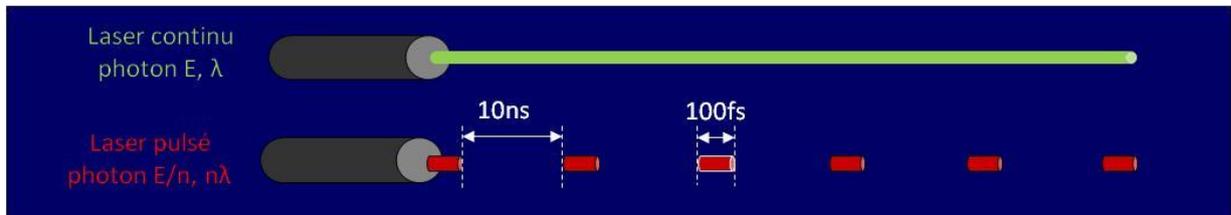


On doit l'invention de la microscopie multiphoton tout d'abord à Maria Goppert-Mayer, une Suédoise qui a obtenu le Prix Nobel de physique en 1963. Elle avait démontré en 1931, au plan théorique, qu'un atome pouvait être excité par l'interaction de deux quanta de lumière (photons), à condition que ces deux photons, de même énergie, arrivent dans un laps de temps très court (femto-seconde). L'énergie étant inversement proportionnelle à la longueur d'onde, la combinaison de l'énergie de deux photons d'une longueur d'onde donnée λ se traduit par une excitation effective, mimant l'absorption d'un seul photon de longueur d'onde $\lambda/2$. Par exemple, l'absorption de deux photons d'un laser infrarouge à 900 nm mime une excitation à 450 nm. L'absorption quasi-simultanée de quanta de lumière n'est pas limitée à deux photons. Si l'énergie fournie est suffisante, un atome peut absorber 3 photons. Ainsi l'absorption de trois photons du même laser infrarouge à 900 nm peut mimer une excitation à 300 nm ($\lambda/3$).

Principe de la microscopie multiphotonique



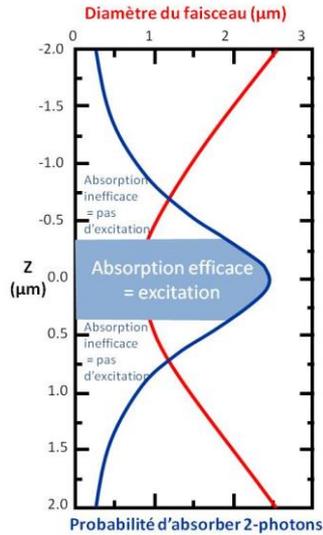
Au plan pratique, cependant, la probabilité d'absorption de deux photons est extrêmement faible : au soleil, une molécule de Rhodamine B absorbe une paire de photons simultanément, une fois tous les 10 millions d'années. L'absorption simultanée de trois photons n'est pas statistiquement envisageable durant l'âge total de l'univers !!!! Pour pallier à cet inconvénient, on utilise des lasers infra-rouges pulsés extrêmement puissants, tels que les lasers Titane-saphir (Ti:S ; ≈ 80 million pulses par seconde ; durée des pulses ≈ 100 fs), ce qui augmente la probabilité d'absorption simultanée de deux ou trois photons.



Ce principe physique a été ensuite appliqué à la microscopie par Watt Webb en 1990 qui a montré que « cette double excitation procure une résolution tri-dimensionnelle intrinsèque en microscopie de fluorescence à balayage laser » (*Denk W, Strickler JH, Webb WW, 1990, Two-photon laser scanning fluorescence microscopy. Science 248, 73-76*).

En clair, cela signifie que statistiquement, l'absorption de deux photons ne peut se produire dans l'échantillon qu'au point focal de l'objectif, là où le diamètre du faisceau laser est minimal et la densité de photons maximale. En effet, dans ce très petit volume, la probabilité que deux photons arrivent de façon simultanée au niveau d'un même atome de la sonde est maximale.

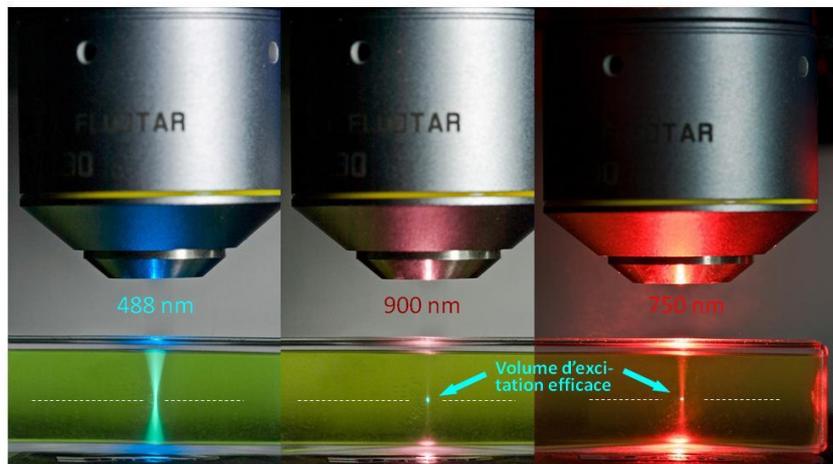
L'excitation efficace est restreinte à la région focale



Cette absorption limitée au point focal délimite alors, après balayage du laser, un espace d'excitation efficace limité à une coupe optique. Comparativement à la microscopie confocale monophotonique (488 nm dans l'image ci-dessous), seul le plan focal sera excité pendant la phase de balayage laser. Les plans situés au-dessus et au-dessous de ce plan, ne recevront que de la lumière infrarouge (900 nm et 750 nm, ci-dessous), non efficace en terme d'excitation des sondes fluorescentes.

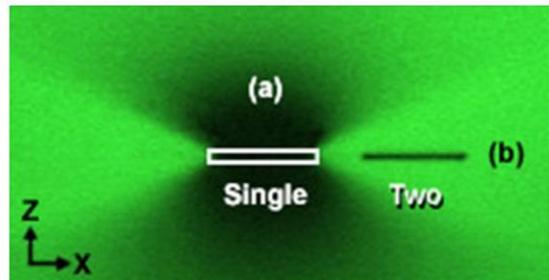
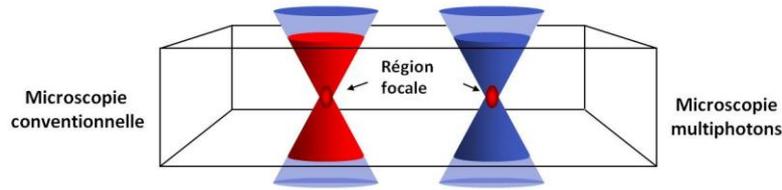
Microscopie confocale

Microscopie multiphotonique



Par ailleurs, dans ces plans, les risques de photo-toxicité et de photo-blanchiment sont quasi nuls. Ainsi, sur l'exemple suivant, un bloc de fluorochrome vert a été soumis sur une longue durée à un faisceau d'excitation monophoton (a) ou biphoton (b). En microscopie multiphoton, seul le plan focal a été photo-dégradé (b), alors qu'en microscopie conventionnelle (a) un grand volume de fluorochrome au-dessus et en dessous du plan focal a également été photo-blanchi.

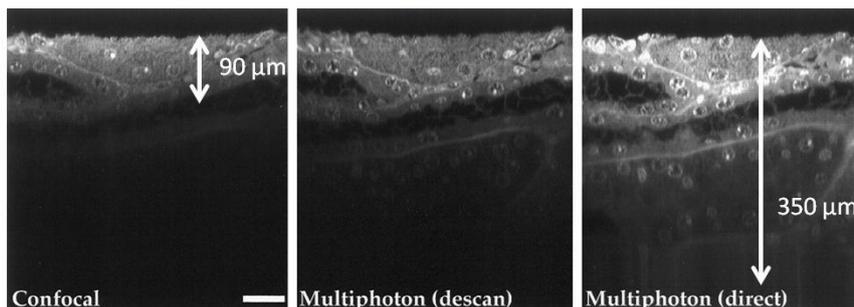
Photo-atténuation restreinte à la région focale



La microscopie multiphotonique est donc une méthode de choix pour l'étude d'organismes vivants, cellules ou tissus, sur des périodes prolongées d'analyse. Plusieurs études, dont l'une réalisée sur l'embryon de hamster (*Squirrell et al., 1999, Nat Biotechnol. 17:763-767*), ont permis de démontrer la plus faible photo-toxicité sur les organismes vivants de la microscopie multiphoton par rapport à la microscopie confocale.

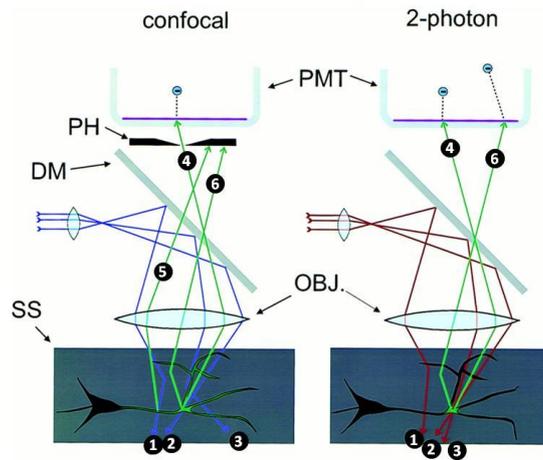
Par ailleurs, les photons dans l'infrarouge sont plus pénétrants que les photons dans la lumière visible et permettent d'explorer des couches plus profondes des échantillons. Dans le cas des tissus animaux, des épaisseurs de plusieurs centaines de μm peuvent être explorées (500 à 1000 μm pour des cerveaux de rat). Dans le cas des tissus végétaux, il convient d'être plus réservé compte tenu de l'abondance de molécules endogènes susceptibles d'absorber la lumière sur le trajet retour.

Infra-rouge : meilleure profondeur de pénétration



Un autre avantage de la microscopie multiphoton est que cette méthode améliore le rapport signal sur bruit. En effet, comme illustré ci-dessous, la collecte de la lumière est plus efficace. En particulier, les photons émis au niveau du plan focal mais diffractés dans l'échantillon peuvent être récupérés sur un microscope multiphoton, alors qu'ils sont rejetés par le diaphragme du microscope confocal. L'une des questions importantes en microscopie multiphoton est la réponse du fluorochrome à l'excitation par le laser pulsé infra-rouge. En effet, tous les fluorochromes ne répondent pas nécessairement à ce type d'excitation. Deux problèmes se posent :

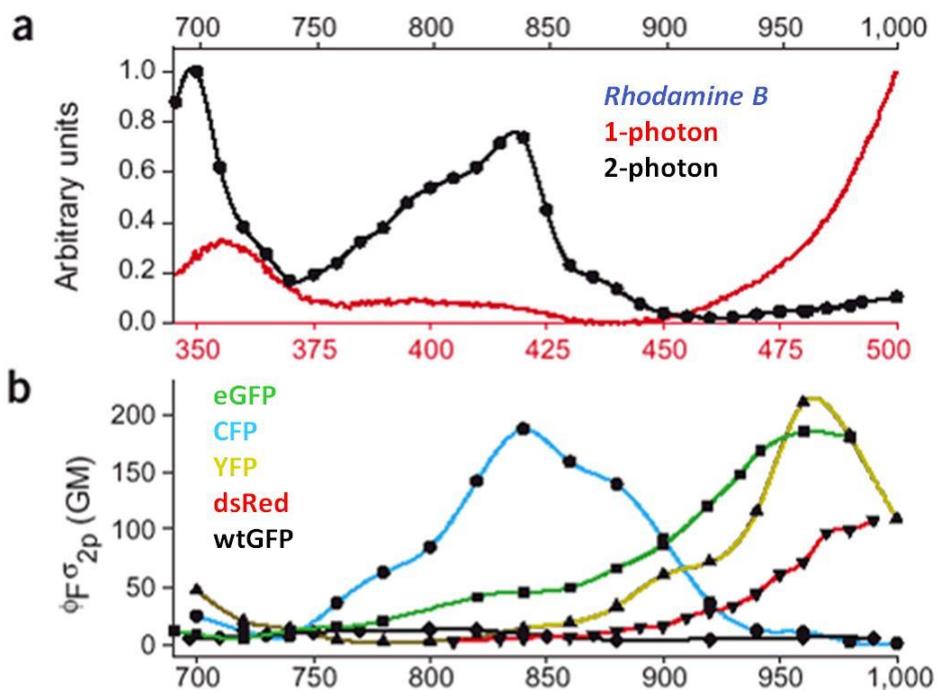
Collecte de la lumière plus efficace



1-3 : photons d'excitation diffractés
 4 : photons d'émission ballistiques (non-diffractés)
 5 : photons d'émission hors plan focal
 6 : photons d'émission du plan focal mais diffractés

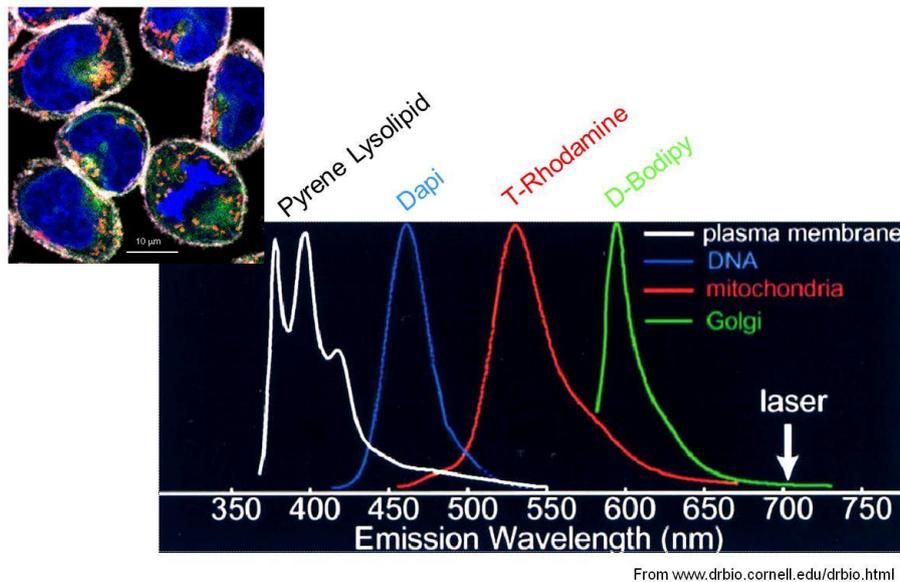
Denk and Svoboda, 1997,
 Neuron 18, 351-357

1. Les spectres d'émission des fluorochromes sont souvent plus étalés en éclairage bi-photon qu'en excitation monophoton. C'est le cas en particulier des protéines fluorescentes issues de la GFP (image **b** ci-dessous).
2. Certains fluorochromes ne se comportent pas du tout selon le principe d'une excitation efficace à $\lambda/2$ de la longueur d'onde infra-rouge utilisée. C'est le cas notamment de la Rhodamine-B (image **a** ci-dessous), excitable dans le visible à 543 nm, et qui devrait donc répondre en biphoton à un éclairage de l'ordre de 1080 nm. L'expérience montre qu'en éclairage biphoton, ce fluorochrome présente un pic d'absorption autour de 840 nm, alors qu'en lumière monophoton, il n'existe aucune absorption à 420 nm. Il convient donc de tester systématiquement les fluorochromes pour lesquels il n'existe pas de données sur leur longueur d'onde d'excitation en mode biphoton.



Ces deux phénomènes peuvent constituer soit un avantage soit un inconvénient. En effet, lors d'examen d'échantillons marqués par plusieurs fluorochromes, il est possible d'exciter simultanément ces fluorochromes par une seule longueur d'onde du laser pulsé. Ceci est avantageux si ces fluorochromes sont localisés dans des compartiments tissulaires ou cellulaires bien séparés. En revanche, s'ils sont colocalisés, l'étalement des spectres d'émission peut poser des problèmes d'interprétation et de validité de cette colocalisation.

Excitation simultanée de nombreux fluorochromes



En conclusion, les avantages et limites de la technique de microscopie multiphotonique, par comparaison avec la microscopie confocale, peuvent être résumés comme suit :

Avantages :

- Excitation strictement localisée au focus
- Observation en profondeur (plus grande pénétration dans les tissus)
- Amélioration du rapport signal/bruit (collecte des photons plus efficace)
- Dommages cellulaires (phototoxicité) restreints au focus
- Photo-blanchiment restreint au focus
- Possibilité de nano-chirurgie en profondeur (au focus)
- Excitation multiple par une λ unique

Inconvénients :

- élévation de la température autour du point focal (lumière infra-rouge)
- Laser puissant, potentiellement destructeur (ex : absorption par les pigments \rightarrow combustion)
- Limitation des fluorochromes et milieux de montage utilisables (problèmes avec les milieux de montage gras, moewiol, glycérol, \rightarrow ébullition du milieu, cloques...)
- Élargissement des spectres et excitation multiple par une λ unique : problème de spécificité des émissions observées.
- Nécessité d'une optique adaptée aux infrarouges