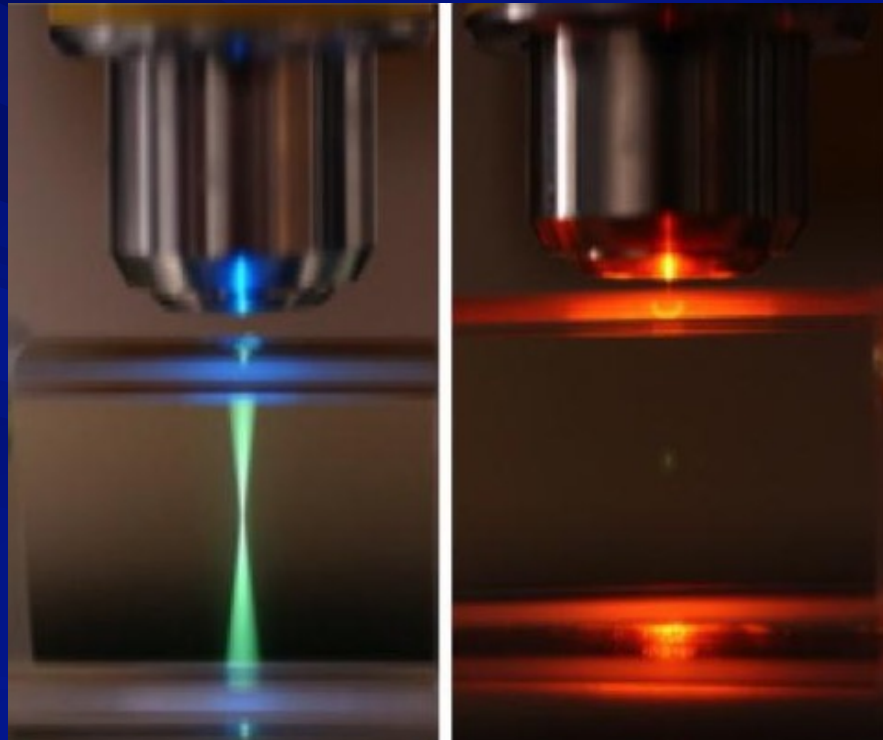


# Microscopie Multiphotonique



# Principaux problèmes rencontrés en microscopie confocale

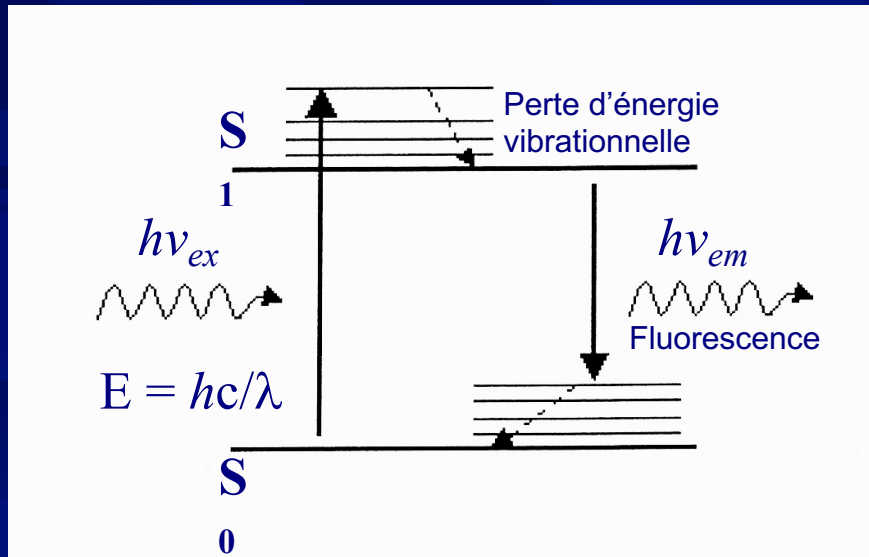
- La dégradation rapide des échantillons biologiques et du signal de fluorescence : phénomènes de **photo-toxicité** et de **photo-blanchiment** (photo-atténuation) rendant certaines analyses *in-vivo* difficiles voire impossibles.
- L'épaisseur « analysable » des échantillons biologiques est limitée à environ **50 microns** (< 80  $\mu\text{m}$ ) : insuffisant pour certaines études.
- Exemples : les **cellules en mitose** et les **embryons** de mammifères sont difficilement analysables en microscopie confocale classique...

# Développement de la Microscopie Multiphotonique

- Théorie de l'excitation biphotonique : Göppert-Mayer (1931)
  - Un atome peut être excité par l'interaction de deux quanta de lumière
- Expérimentation et validation : Kaiser & Garrett (1961)  
Two-Photon Excitation in CaF<sub>2</sub>: Eu<sup>2+</sup>
- Application à la microscopie : Denk et coll. (1990)
  - Le mode multiphotonique procure une résolution tridimensionnelle intrinsèque en microscopie de fluorescence à balayage laser
- Lasers pulsés Titane-Saphir « modelocked » commerciaux (1992)
- Premier microscope multiphoton commercial : BioRad Microscience, UK (1996)
- Systèmes complets commercialisés par Zeiss (détient la licence), Olympus, Leica

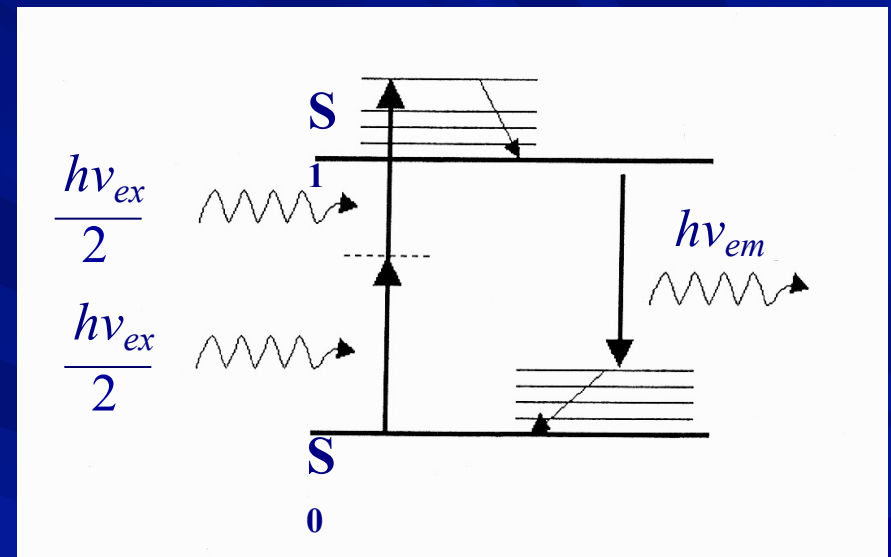
# Principe de l'excitation à deux photons

## Processus de fluorescence en excitation à un photon



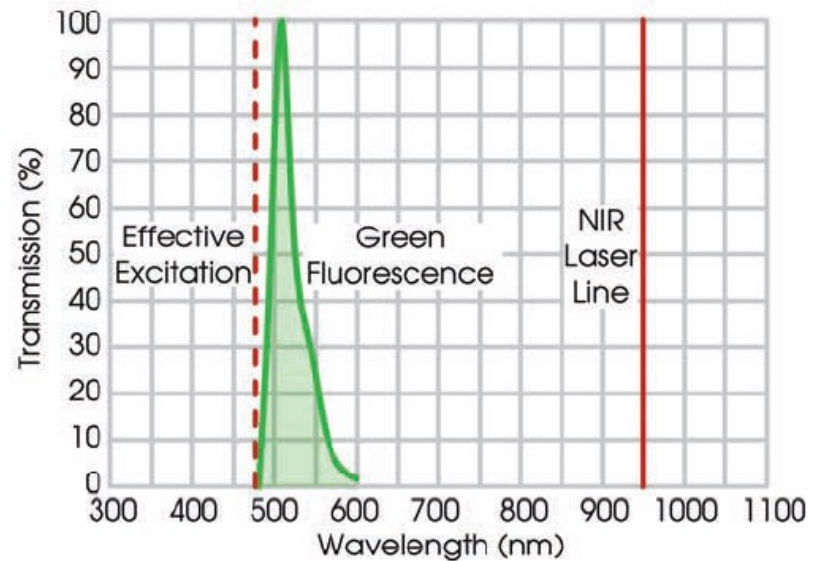
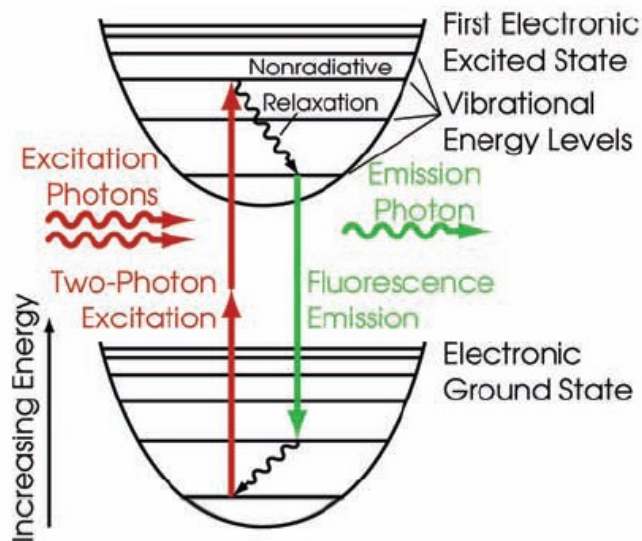
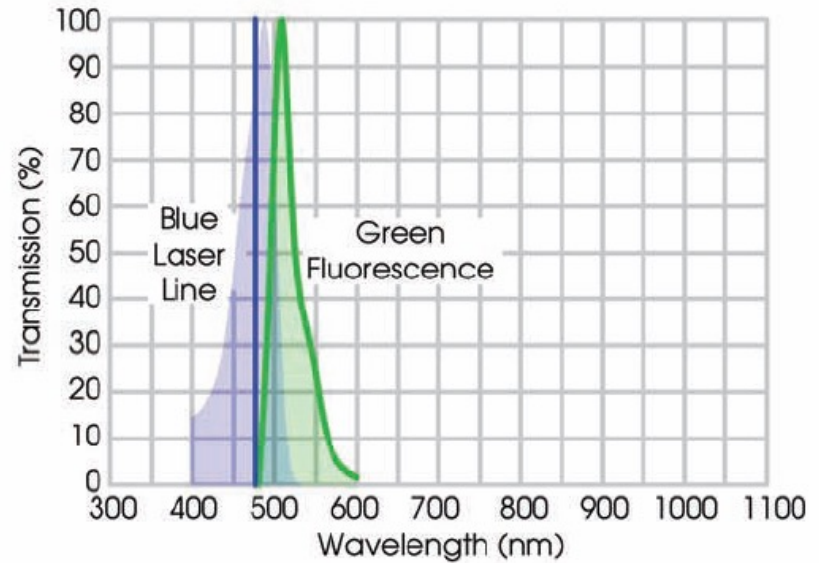
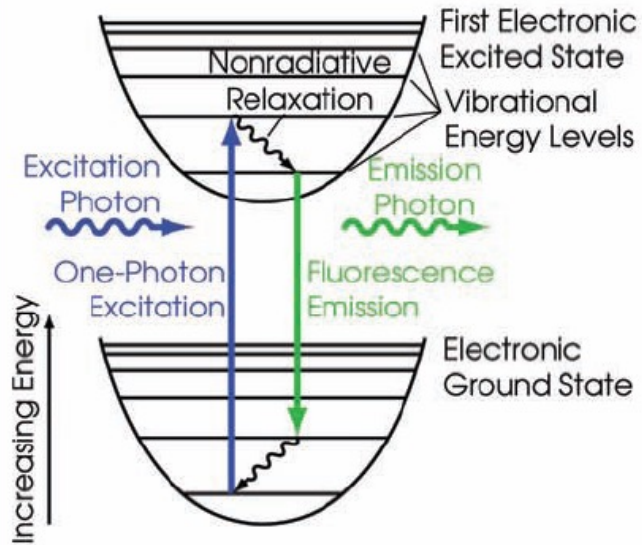
L'énergie d'un seul photon est absorbée par un fluorochrome pour passer d'un état d'énergie basal ( $S_0$ ) à un état excité ( $S_1$ )

## Processus de fluorescence en excitation à deux photons

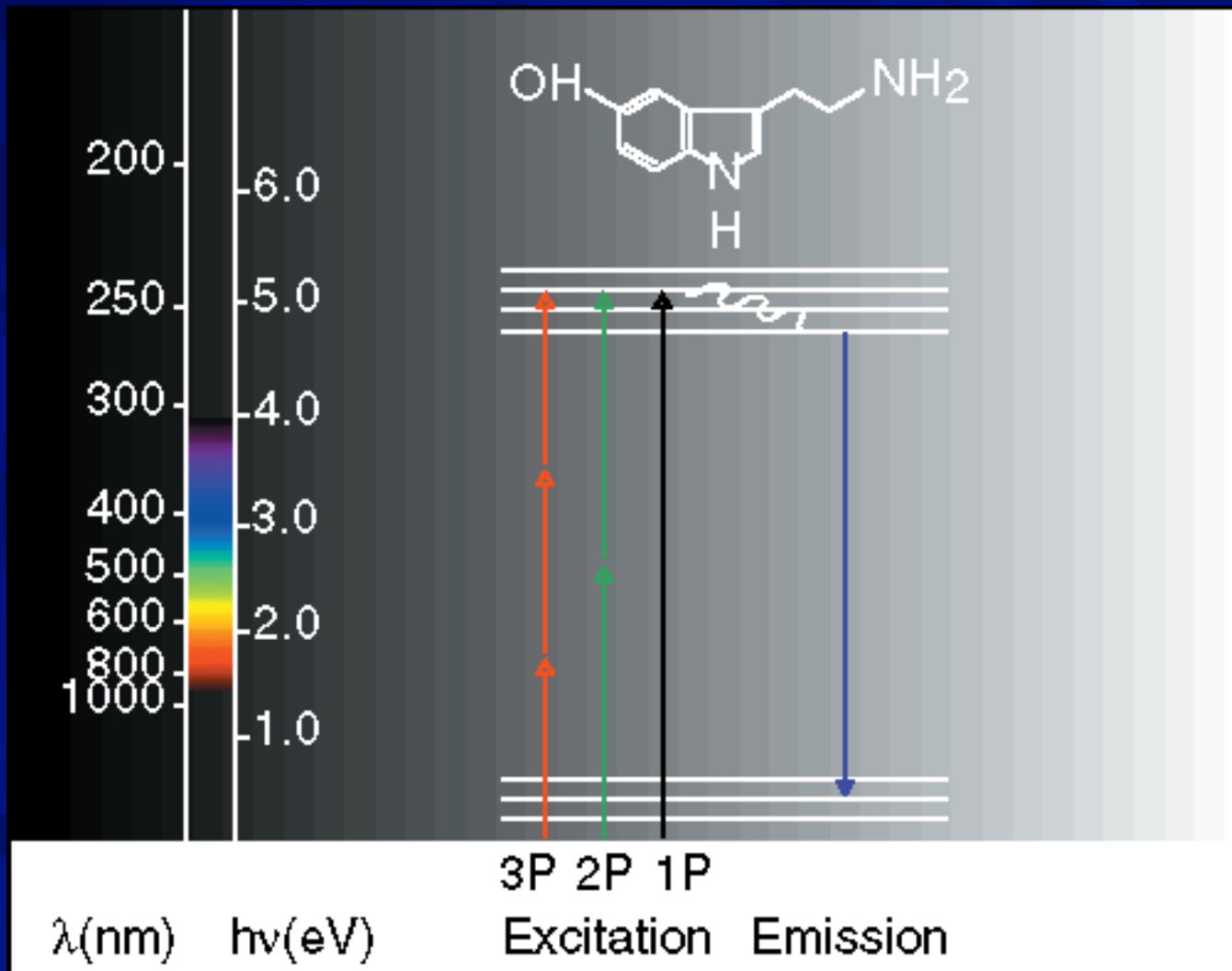


Deux photons d'énergie deux fois plus faible (et donc de longueur d'onde deux fois plus élevée) sont absorbés par la molécule dans un laps de 10 femto-secondes (1 femto-seconde =  $10^{-15}$  s)

➤ Les caractéristiques du rayonnement émis par le fluorochrome en excitation à deux photons sont inchangées



Une molécule peut changer d'état d'énergie par absorption de 1, 2 ou 3 photons



# Spécificité de l'excitation à deux photons

- En excitation à **un photon** :  
le nombre de photons absorbés par unité de temps est proportionnel au flux de la lumière d'excitation

$$N_{\text{abs}} = \sigma \phi(\lambda) \phi_{\text{exc}}$$

➤ **Processus linéaire**

- En excitation à **deux photons** :  
le nombre de photons absorbés par unité de temps est proportionnel au carré de l'intensité de la lumière

$$N_{\text{abs}} = \sigma I_{\text{exc}}^2$$

➤ **Processus non-linéaire**

# Conditions pour l'absorption biphotonique

Probabilité d'excitation biphotonique ( $E_{2ph}$ ) :

$$E_{2ph} = P^2 / (t.F)$$

P = Puissance moyenne

t = Durée de l'impulsion

F = Fréquence de répétition

Il faut une très haute densité en photons pour que l'absorption biphotonique ait lieu :

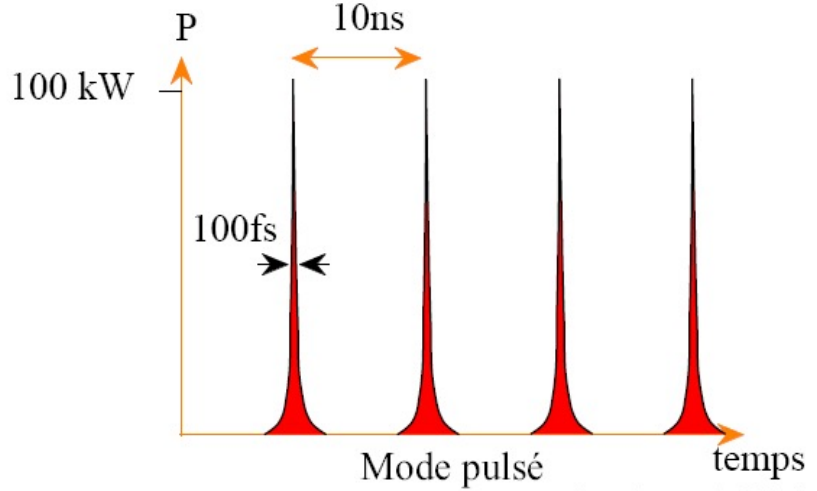
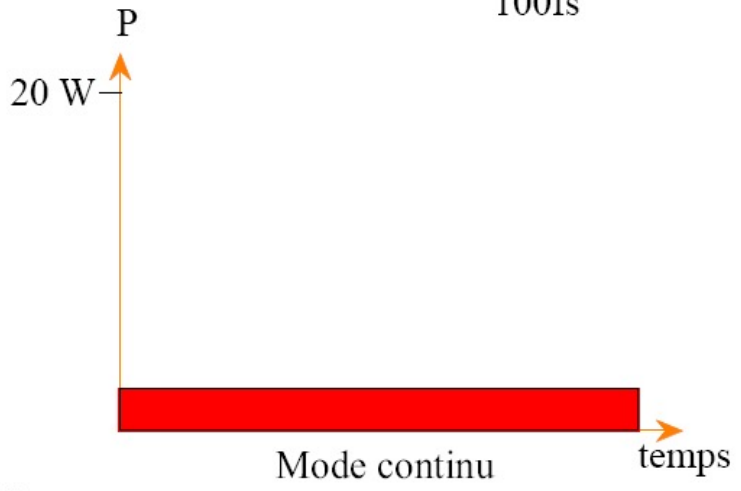
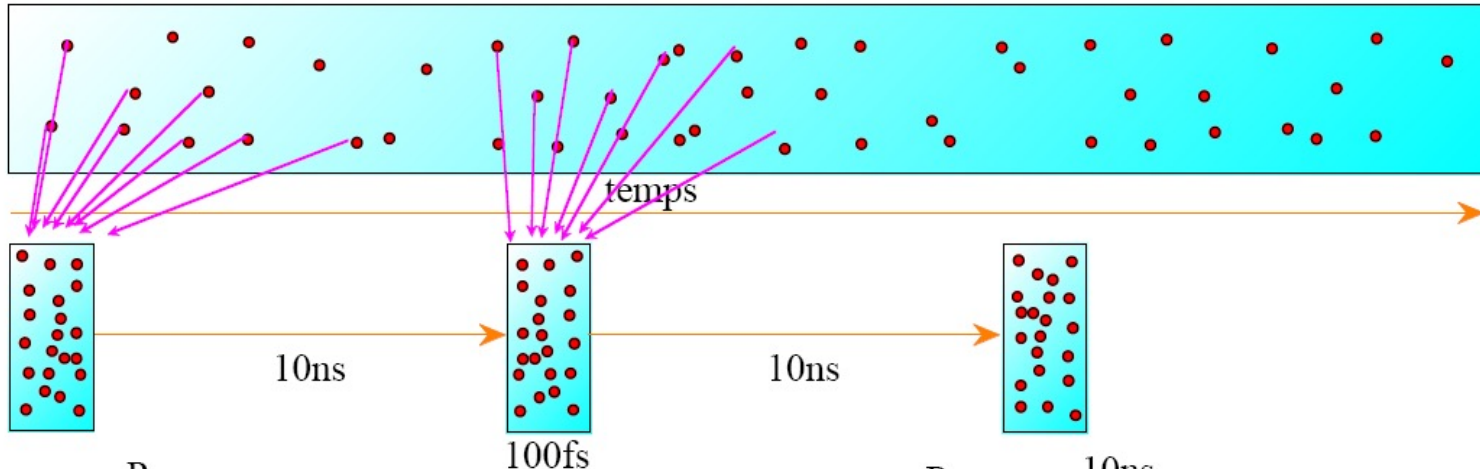
➤ Concentration des photons, dans l'espace, par focalisation à l'aide d'un objectif à grande ouverture numérique et, dans le temps, par utilisation d'une source pulsée laser femto-seconde ( $10^{-15}$  s)



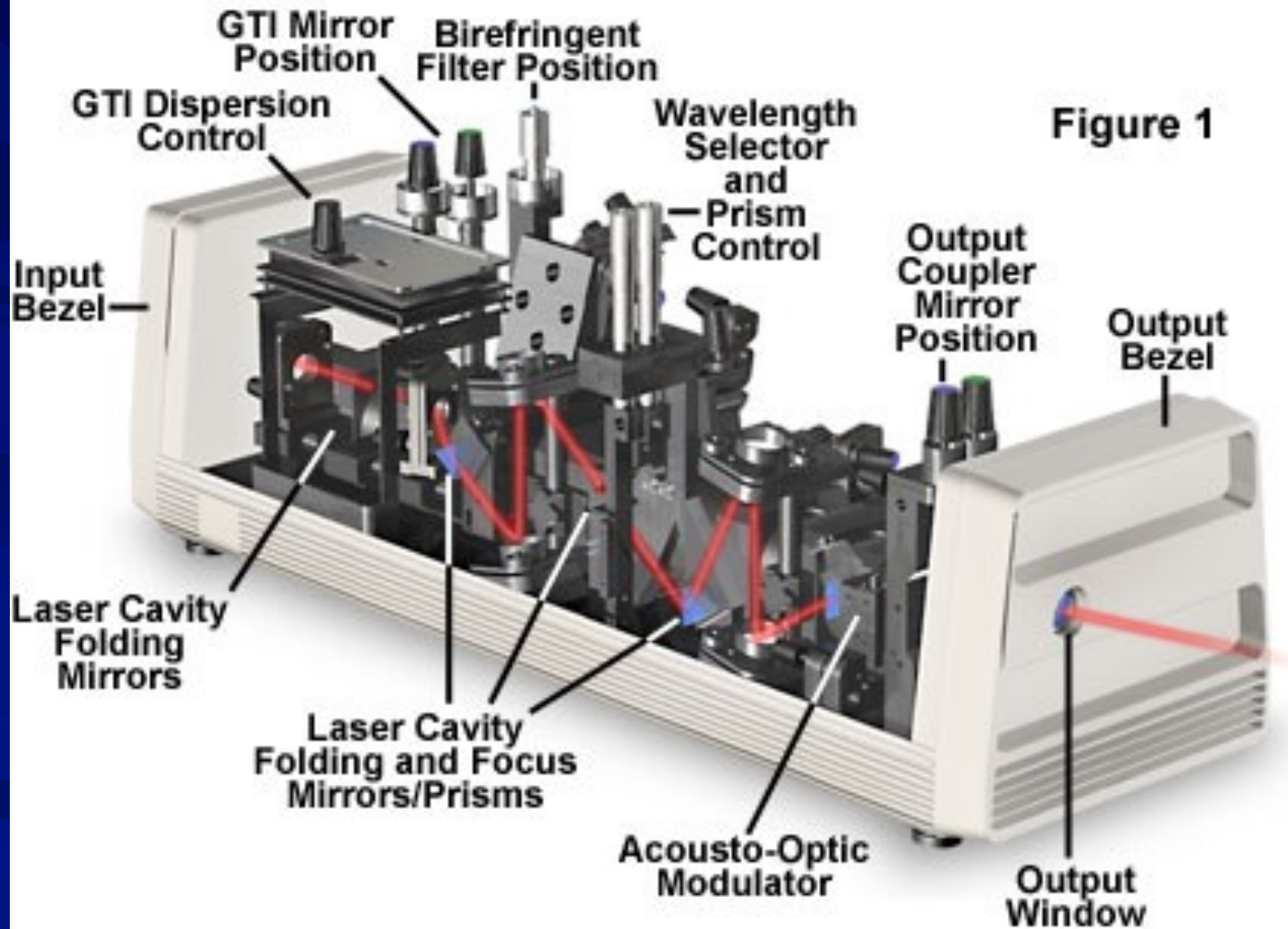
# Spécificité de l'excitation à deux photons

- En excitation à un photon, le flux de photons nécessaire à l'excitation est relativement faible : excitation par une source de lumière classique (lampe au mercure, laser continu)
- En excitation à deux photons, le flux de photons incidents doit être très élevé : excitation multiphotonique par des impulsions laser femto-secondes ( $10^{-15}$  s)
- L'utilisation de sources laser continues n'est pas adaptée car la puissance moyenne serait beaucoup trop élevée et dégraderait très rapidement l'échantillon
- Les sources laser pulsées femto-secondes fournissent le flux de photons nécessaire tout en conservant une puissance moyenne d'illumination faible (100 à 1000 fois moins qu'avec une source laser continue)

# Lasers pulsés



# Spectra Physics Tsumani<sup>®</sup> Ti:Sapphire Mode-Locked Laser



# Choix du laser pulsé

## Deux lasers séparés (Verdi + Mira)



Coherent

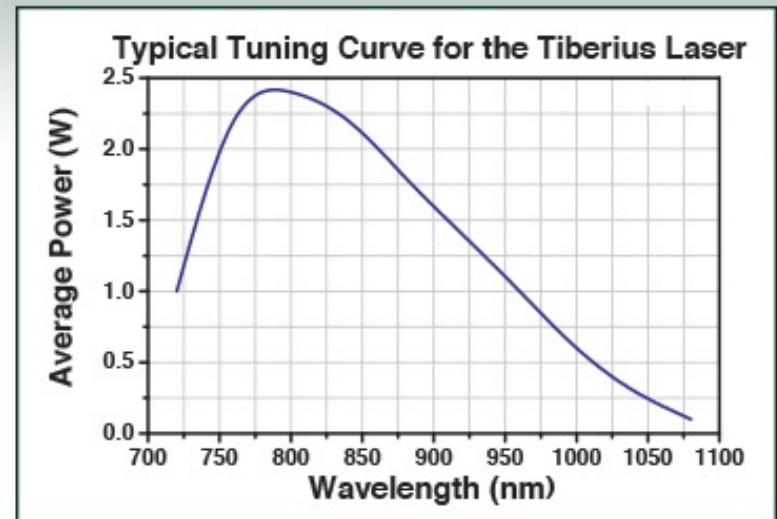
- Gamme de longueurs d'ondes :  
690 - 1080 nm
- Puissance du laser de pompe variable : 5 - 8 - 10 W
- Grande flexibilité mais moins de convivialité

## Système compact (Chameleon)



Coherent

- Gamme de longueurs d'ondes :  
720 - 950 nm
- Puissance du laser de pompe fixe : 10 W
- Système scellé mais plus grande simplicité d'utilisation



# Lasers pulsés accordables

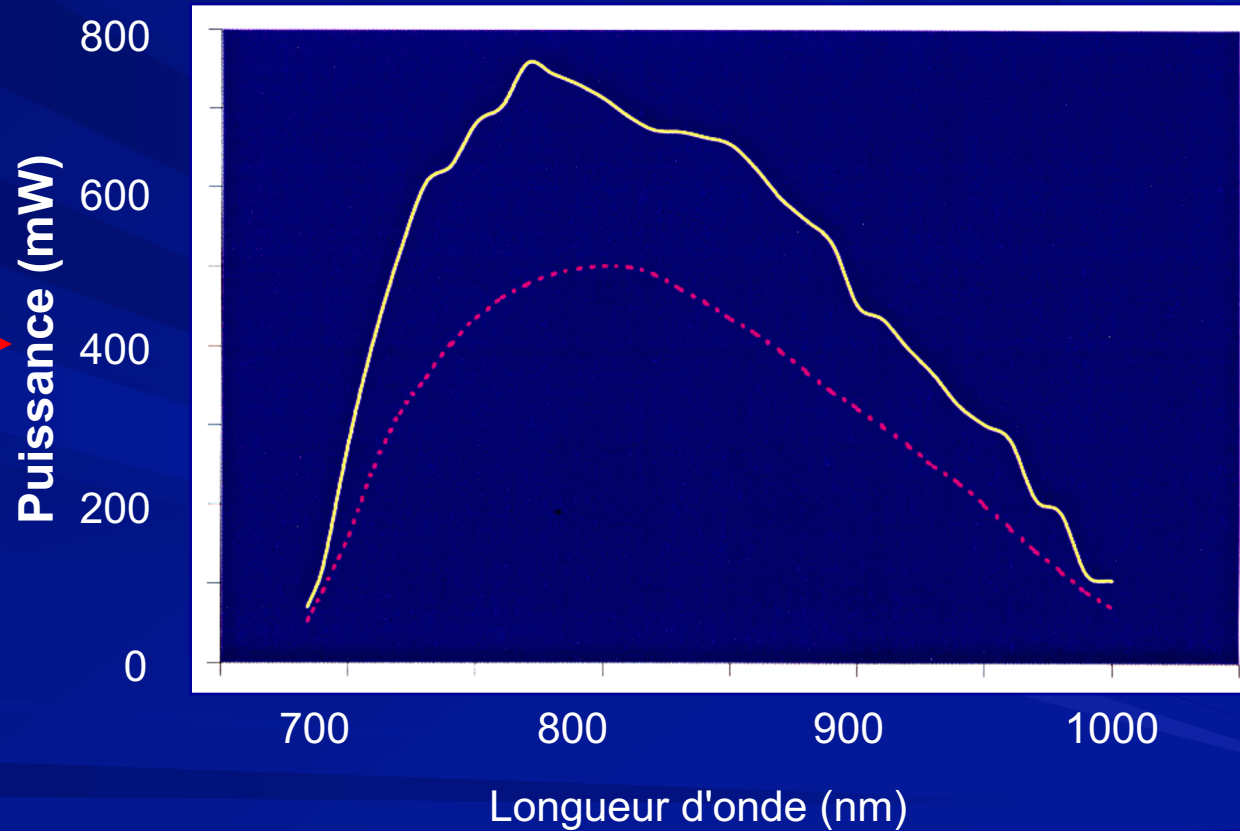
Laser Argon ionisé  
8 - 15 W (488, 514 nm)

Laser pulsé  
Titane:Saphir  
Femto seconde

Laser à solide  
5 W (532 nm)

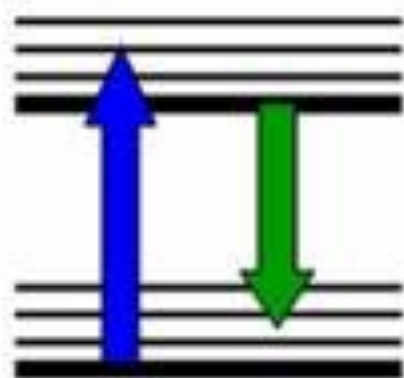
Infra-  
rouge

Courbe « d'accordabilité » du laser

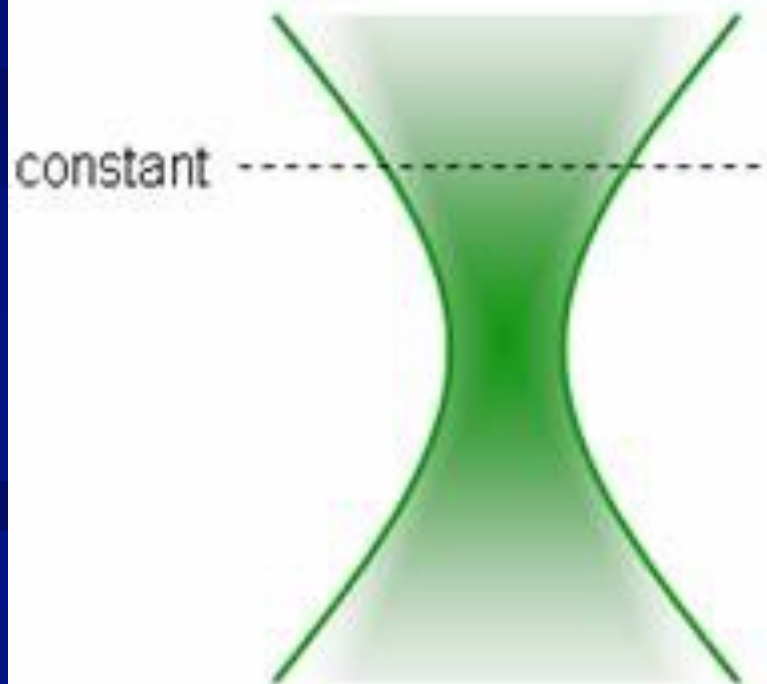
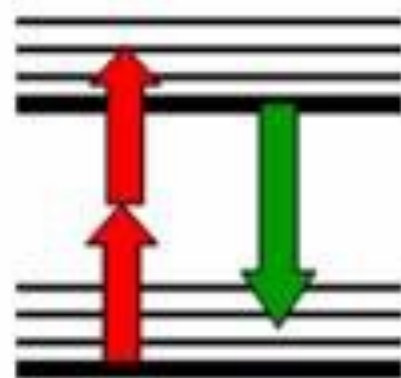


Réglage en continu sur  
toute la gamme 680 - 1050 nm

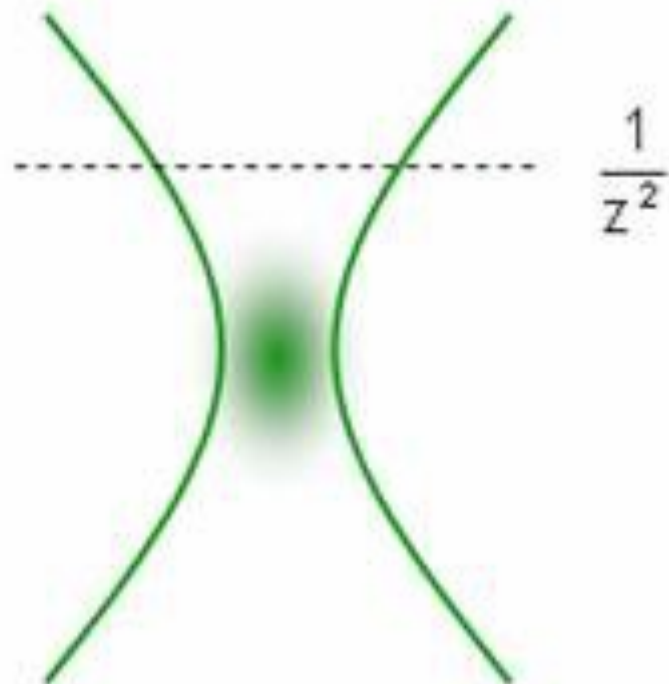
1-photon excitation



2-photon excitation

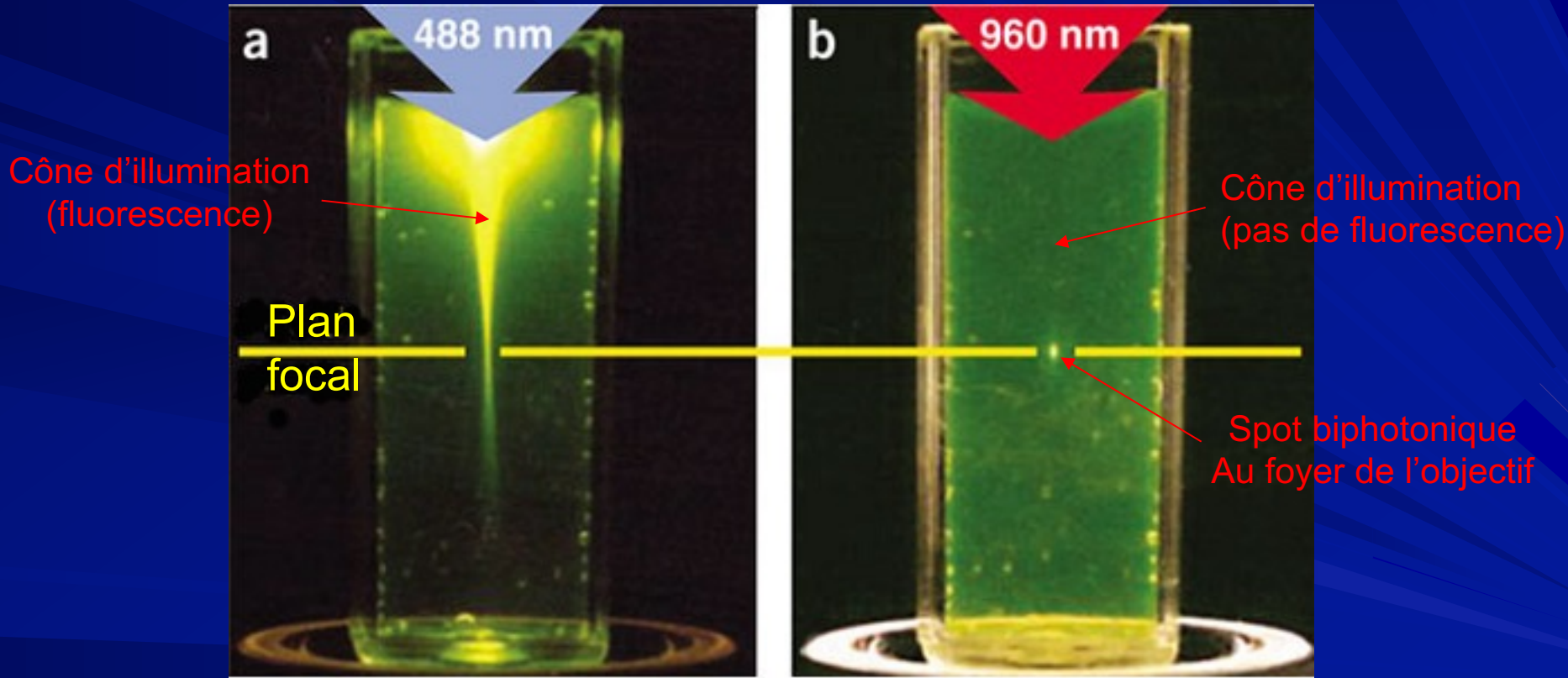


$z$



# Effet biphotonique

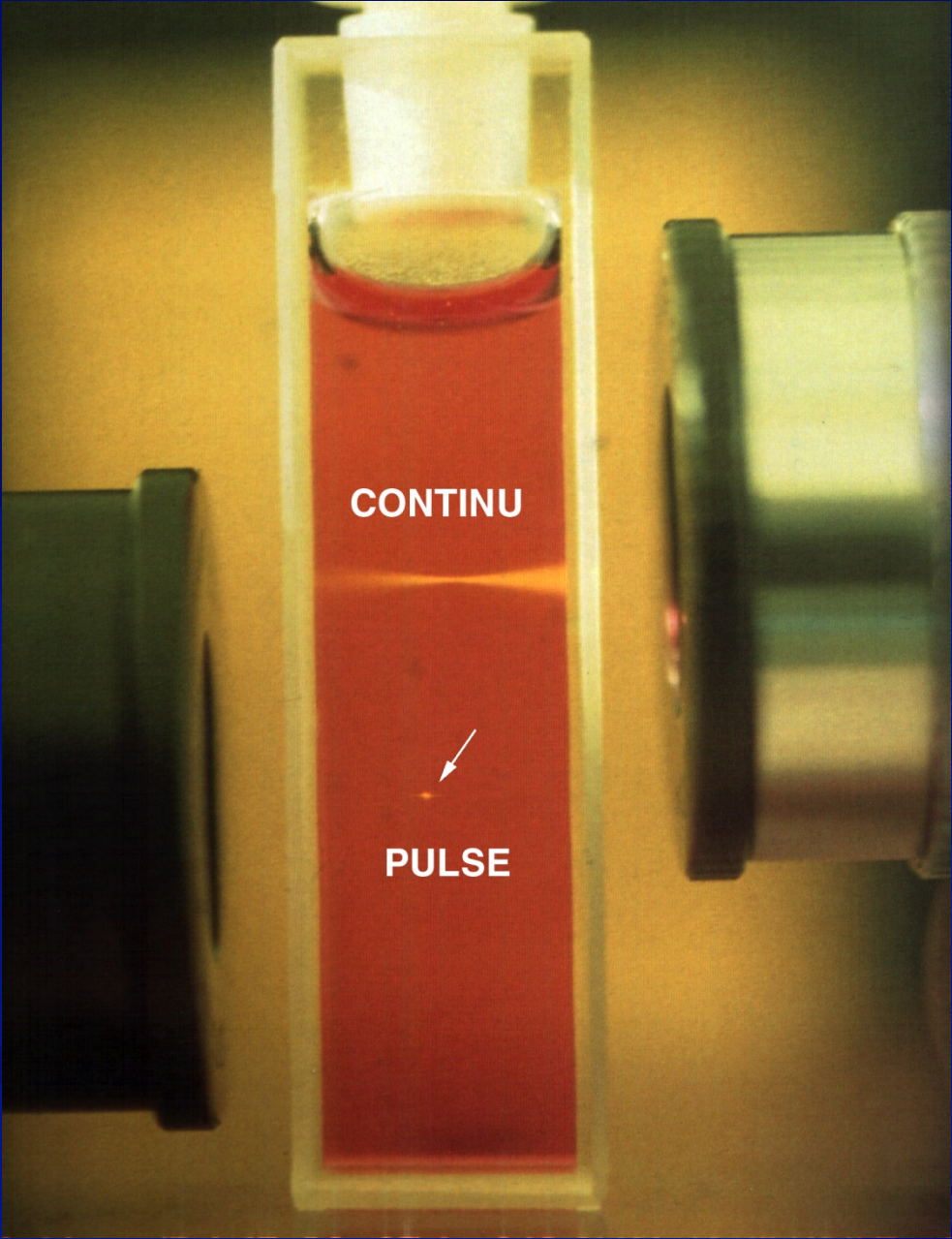
En microscopie à balayage laser à deux photons, l'excitation est strictement restreinte au volume focal : résolution tridimensionnelle intrinsèque



Fluorescence suite à une absorption à un photon

Fluorescence suite à une absorption à deux photons

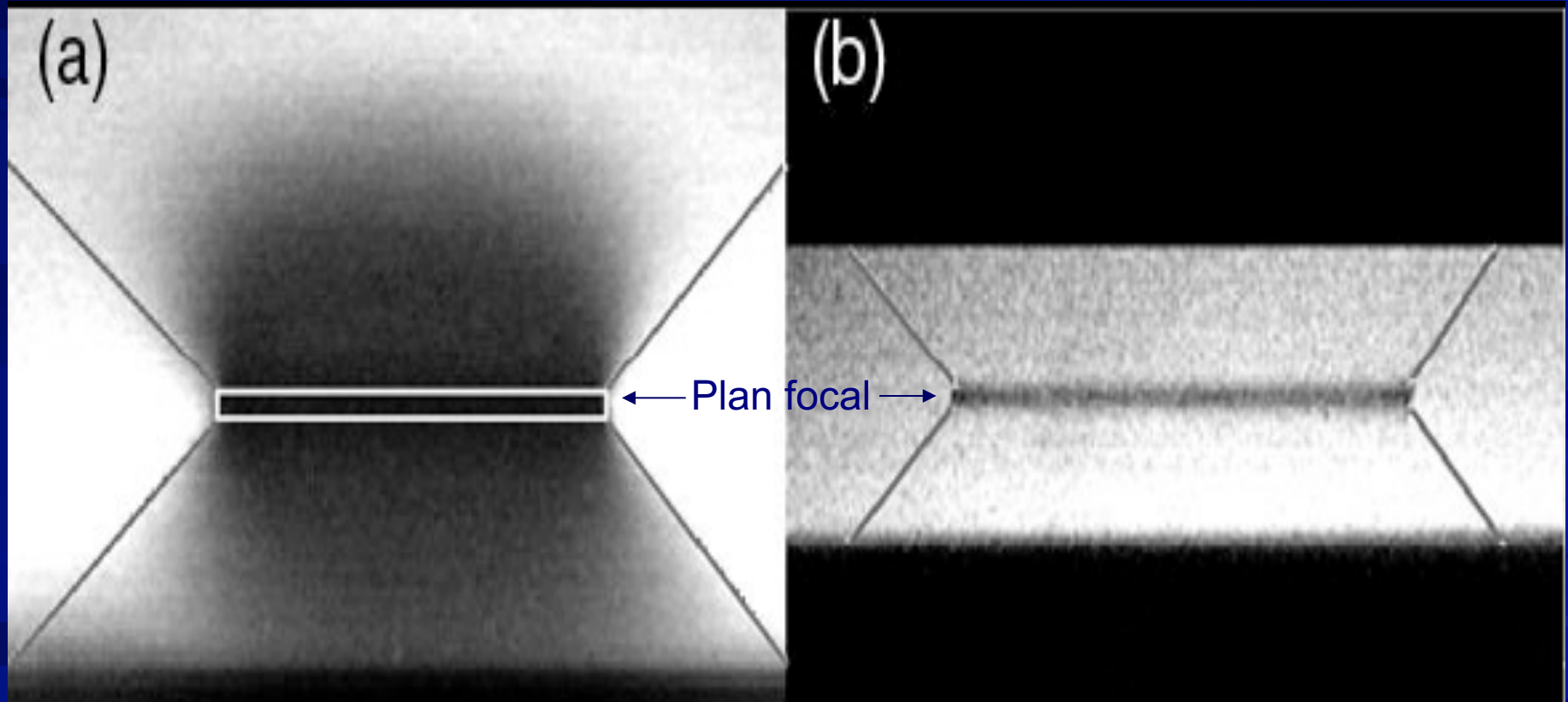




# Phénomène de photo-atténuation (photo-blanchiment)

Mode  
monophotonique

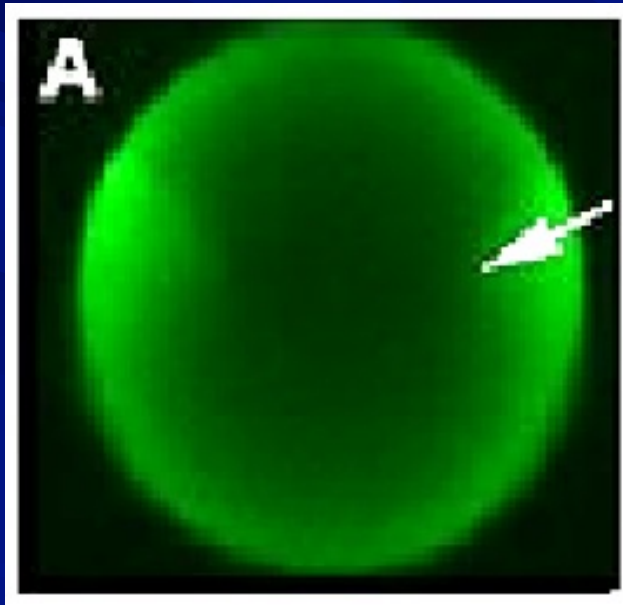
Mode  
multiphotonique



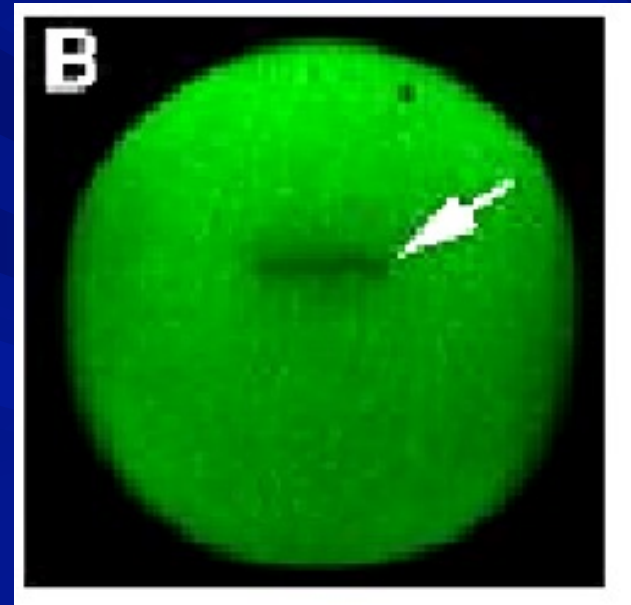
➤ En mode multiphotonique (b) le photo-blanchiment (zone sombre) est localisé exclusivement dans le plan focal.

# Phénomène de photoblanchiment

Exemple du photoblanchiment de la fluorescéine dans une bille d'alginate

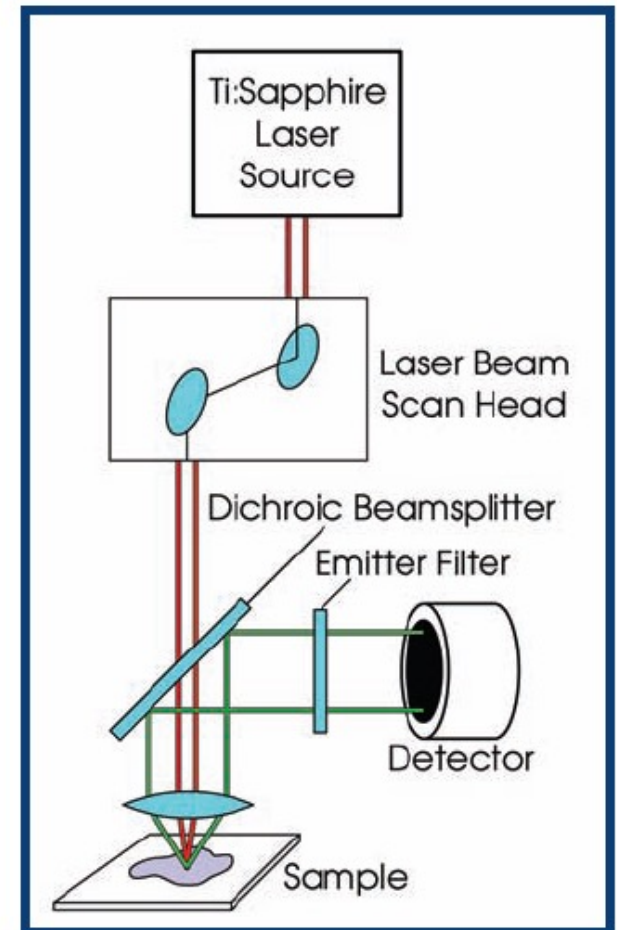
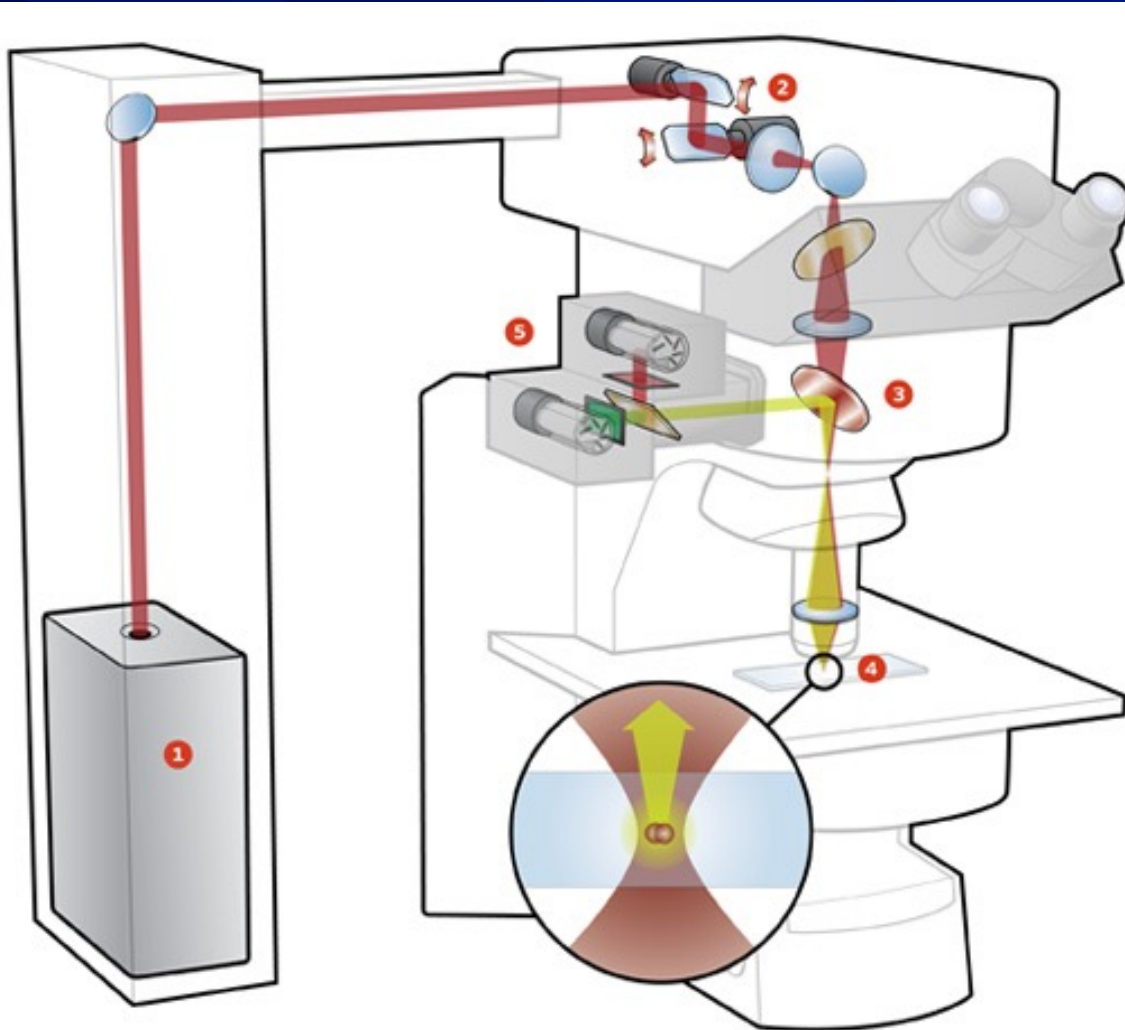


Excitation en mode  
monophotonique

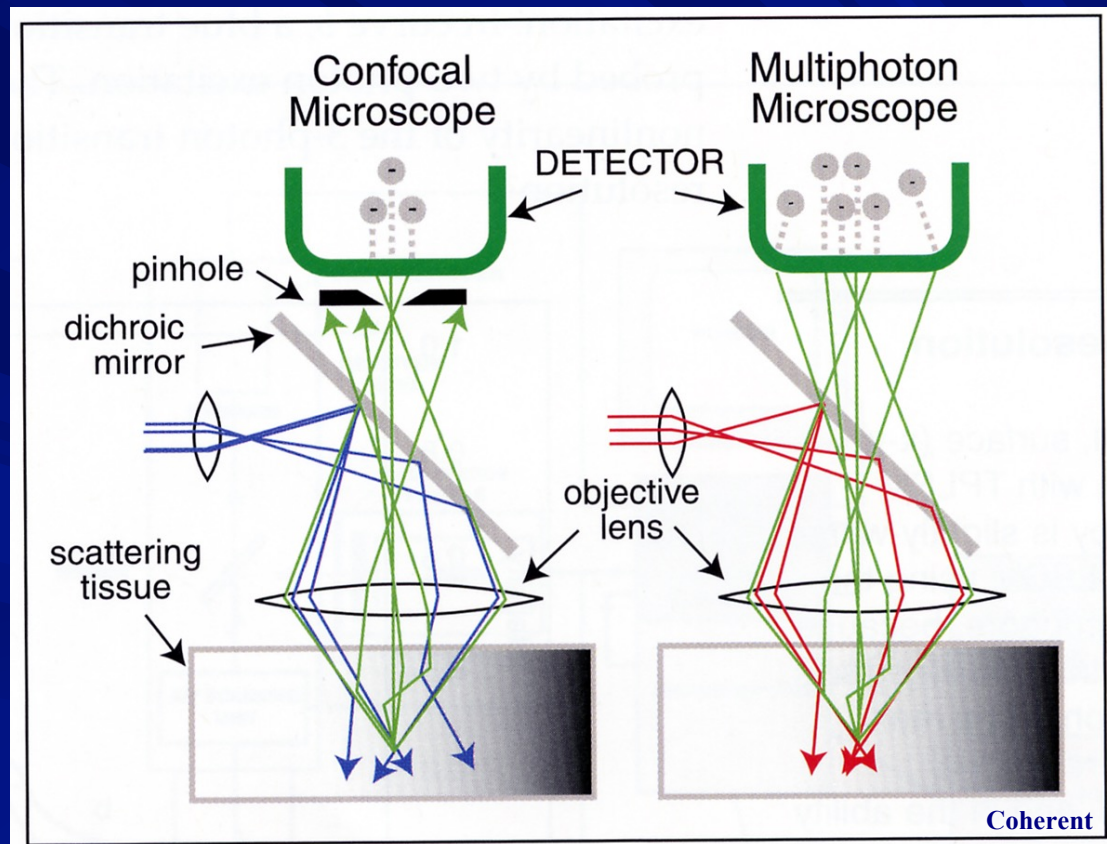


Excitation en mode  
multiphotonique

# Schéma de principe d'un microscope multiphoton



# Trajets optiques en microscopie confocale et microscopie à deux photons

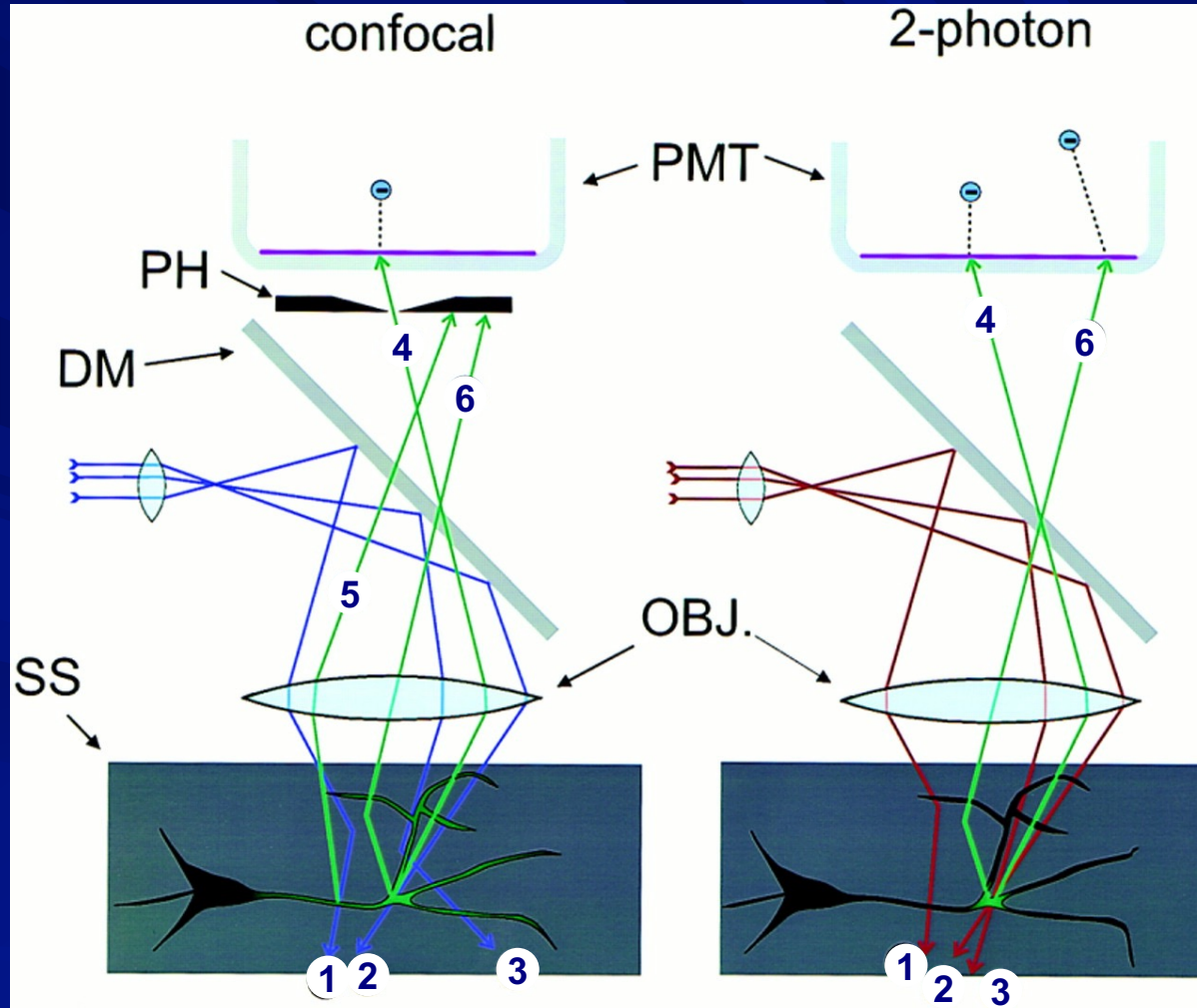


- Source laser continue visible
- Filtrage spatial de la lumière par le pinhole (diaphragme)

- Source laser pulsée femto secondes I.R.
- Fluorescence uniquement au point focal : filtrage inutile donc pas de pinhole

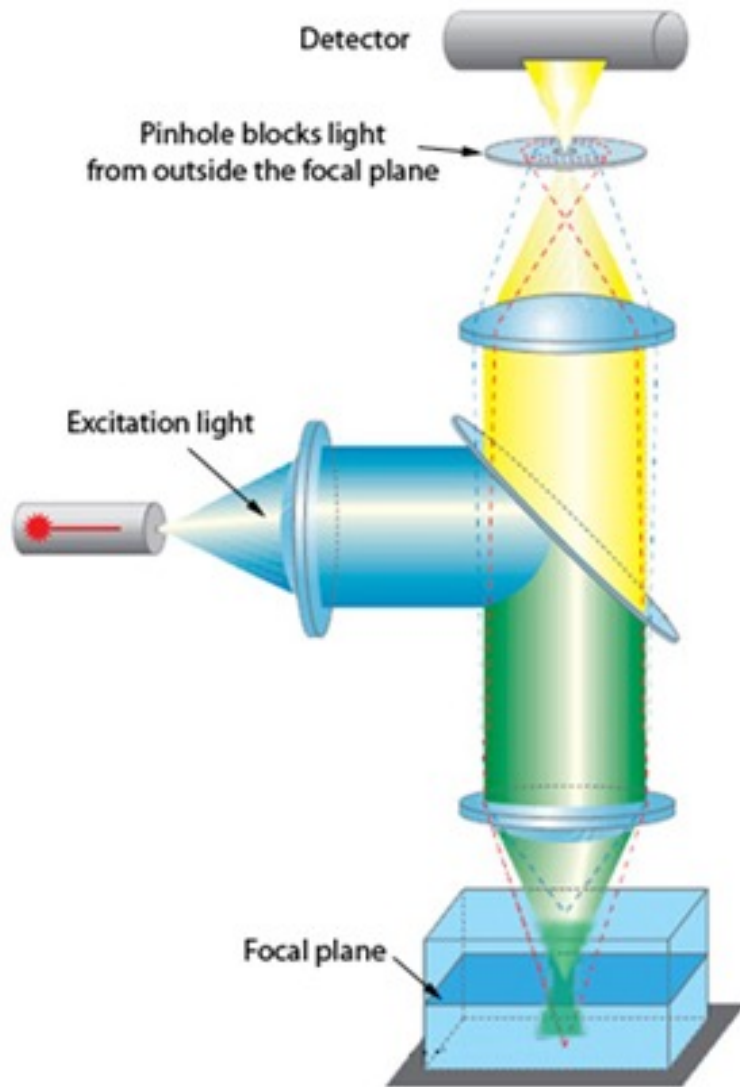
- En microscopie confocale les « coupes optiques » sont obtenues par la détection
- En microscopie biphotonique les « coupes optiques » sont obtenues par l'excitation

# Collecte de la lumière plus efficace

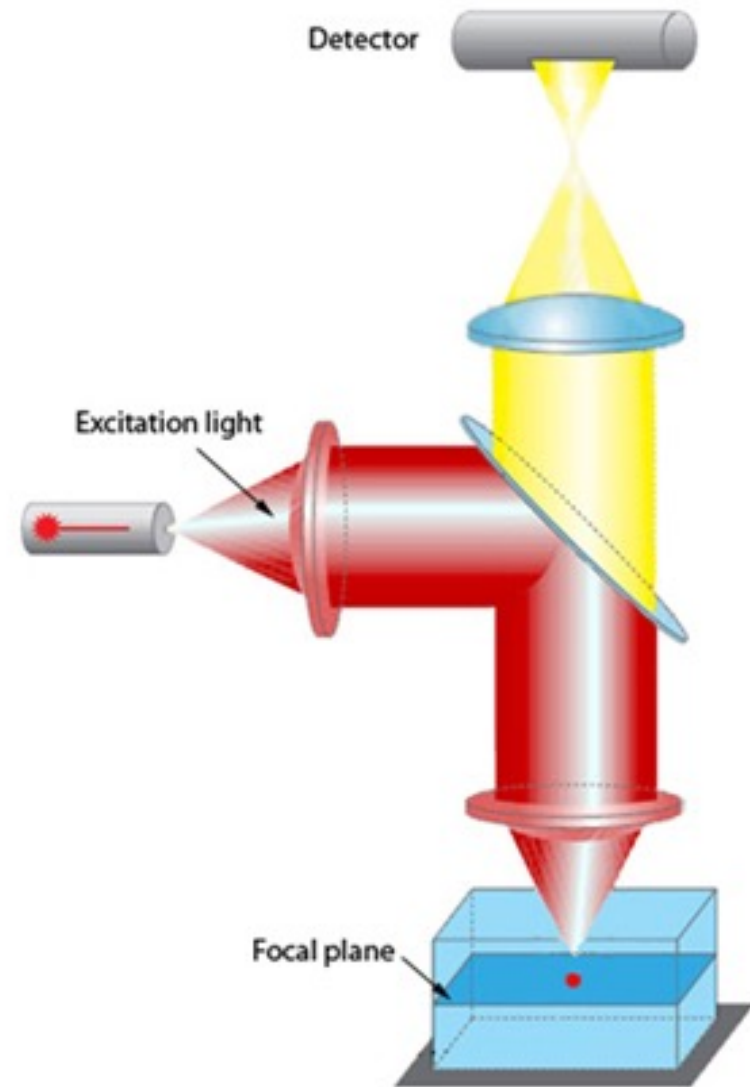


- 1-3 : photons d'excitation diffractés
- 4 : photons d'émission balistiques (non-diffractés)
- 5 : photons d'émission hors plan focal
- 6 : photons d'émission du plan focal mais diffractés

# 1-Photon



# 2-Photon



# Fluorophore Excitation in Multiphoton Microscopy

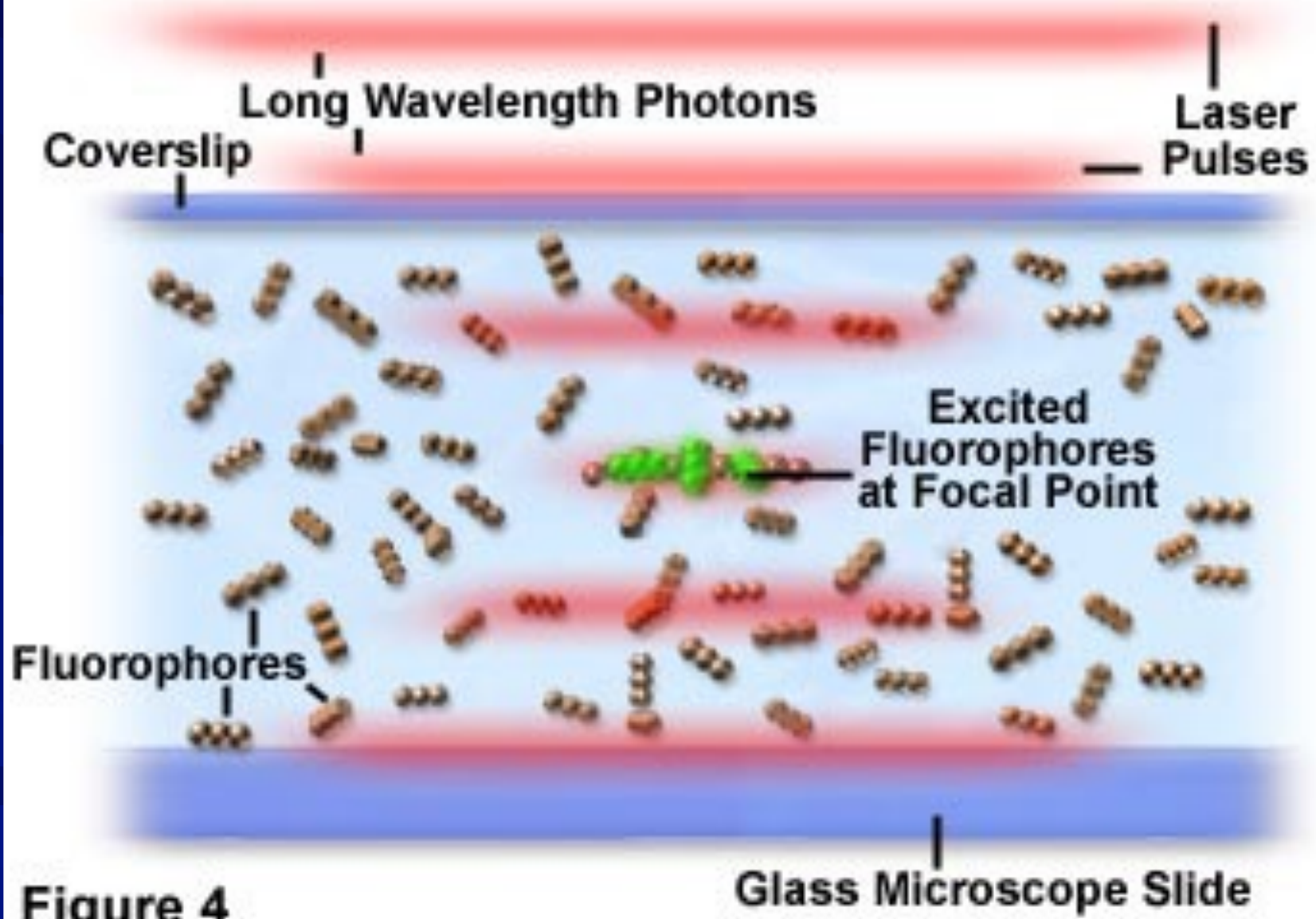


Figure 4

Glass Microscope Slide



# Multiphoton Excitation Fluorescence Microscopy

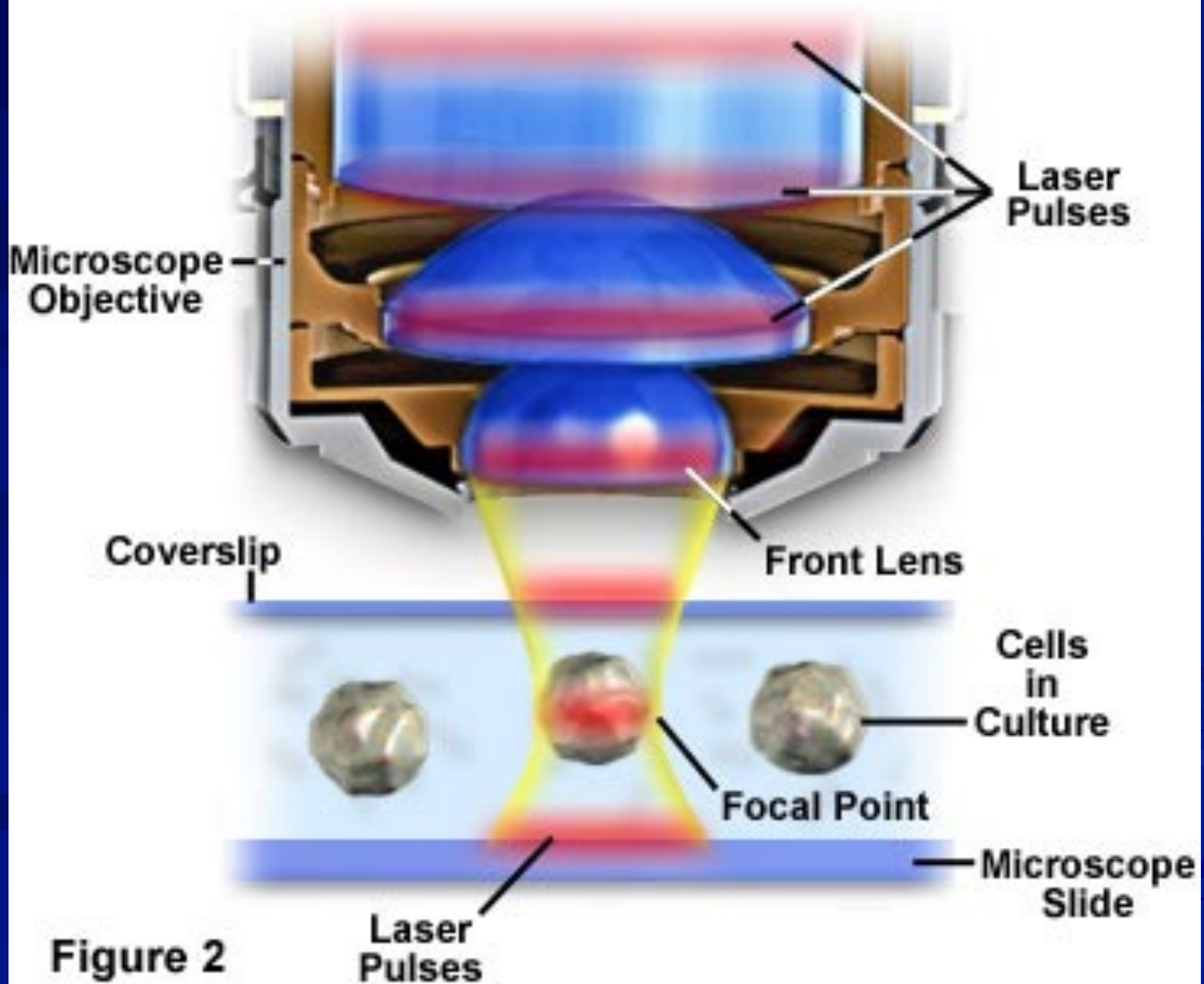
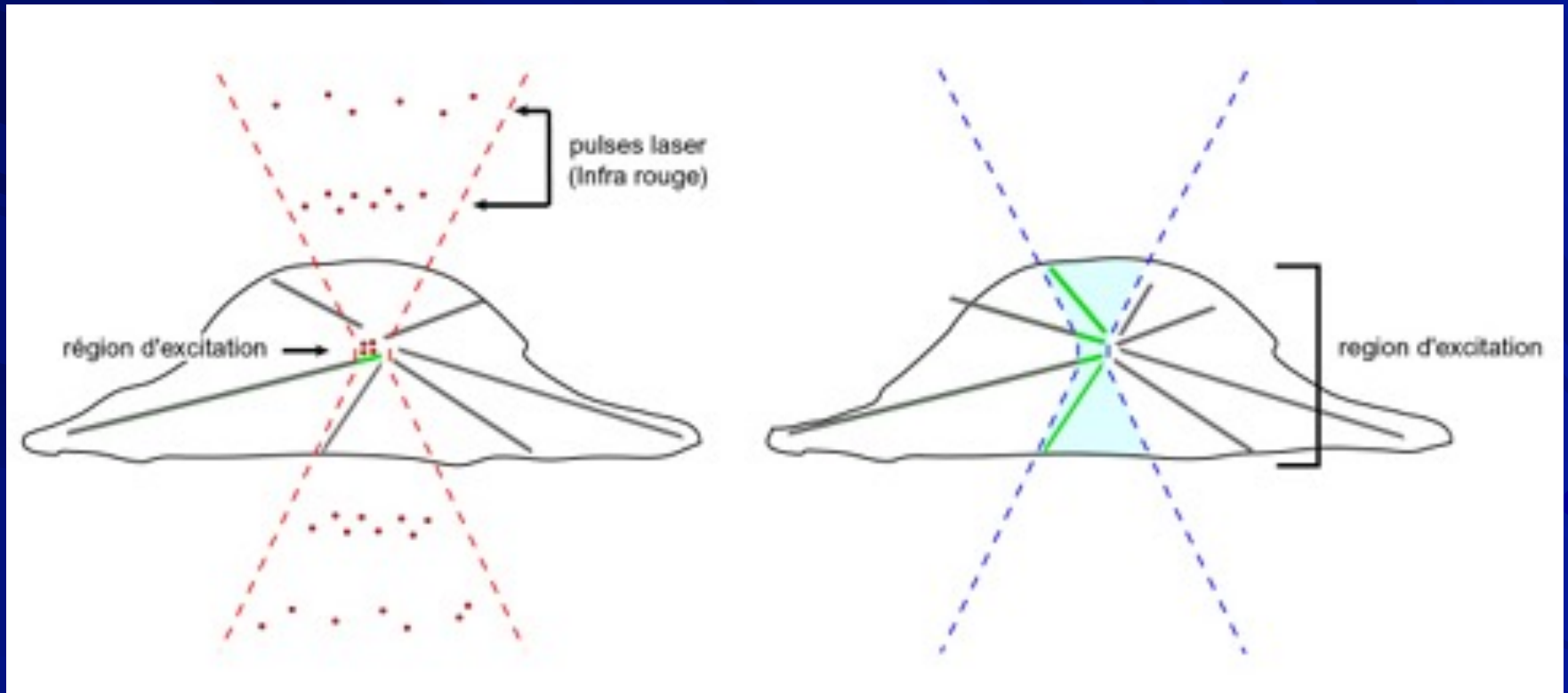


Figure 2

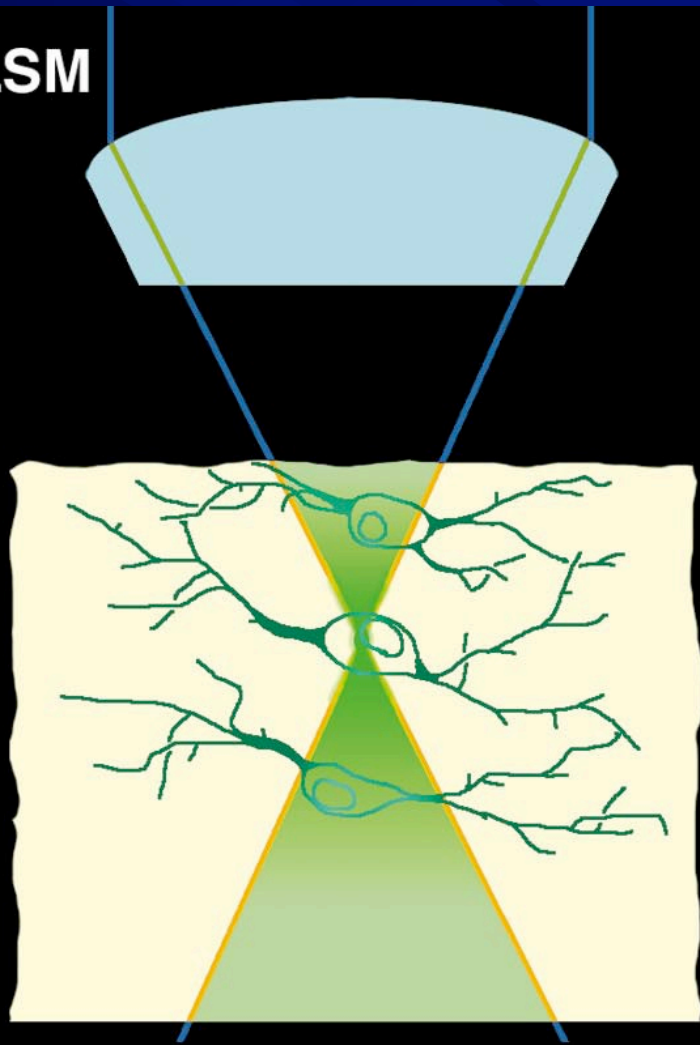
## Microscopie multiphotonique

## Microscopie confocale

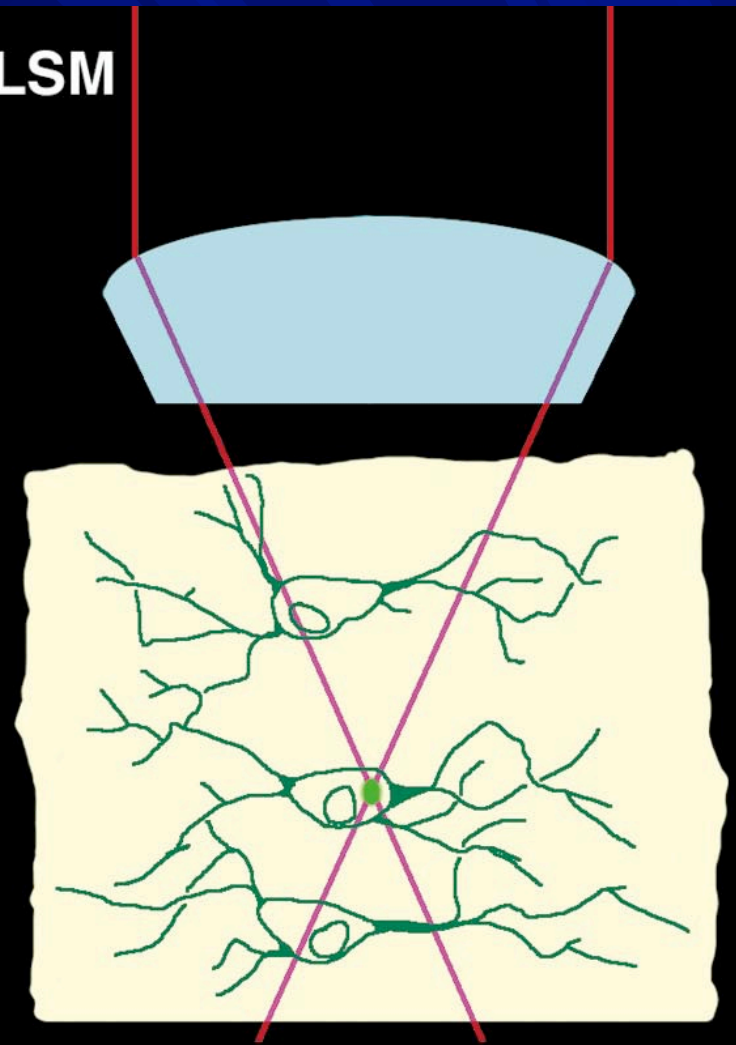


Cellule avec marquage des microtubules (tubuline-GFP)

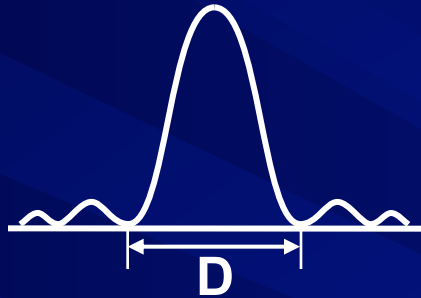
**CLSM**



**TPLSM**



# Résolution en microscopie multiphotonique



$$\delta_{xy} = \frac{D}{2} = \frac{0,61\lambda}{\text{ON}}$$

$\lambda = 488 \text{ nm} : \delta_{xy} = 0,21 \text{ }\mu\text{m}$   
 $\lambda = 900 \text{ nm} : \delta_{xy} = 0,4 \text{ }\mu\text{m}$

⇒ **Résolution latérale multipliée par 2**

$$D = \frac{1,22\lambda}{n \cdot \sin\alpha} = \frac{1,22\lambda}{\text{ON}}$$

	Longueur d'onde (nm)	Résolution latérale (x-y, $\mu\text{m}$ )	Résolution axiale (x-z, $\mu\text{m}$ )
Confocal	350-500	0,14 – 0,20	0,30 – 0,43
Bi-photon	700-1000	<b>0,20 – 0,29</b>	<b>0,60 – 0,90</b>

En pratique :

- La résolution en microscopie confocale n'est pas toujours optimale (le pinhole est rarement fermé au maximum)
  - **En pratique, résolution similaire (ou meilleure) en microscopie multiphotonique**

# Quelques données techniques

## Microscopie confocale à balayage laser

Laser (domaine visible ou UV)

- Laser en mode continu
- Puissance du laser : environ 1,5 mW au plan focal

## Image

- Profondeur < 80 microns
- Résolution radiale 0,15  $\mu\text{m}$
- Résolution axiale 0,6  $\mu\text{m}$

## Microscopie à balayage laser à deux photons

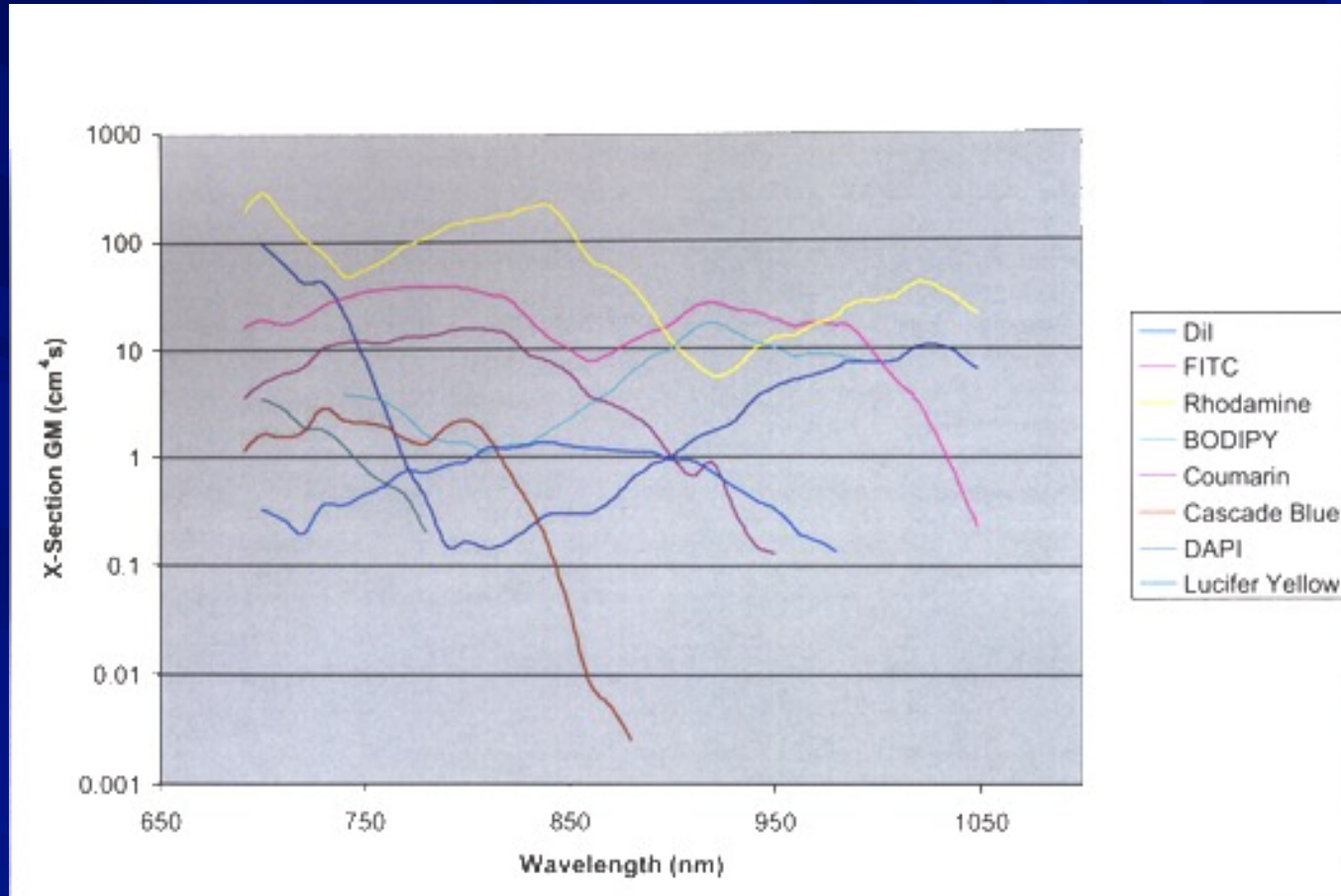
Laser (domaine Infra Rouge)

- Laser pulsé (femto secondes)
- Durée de l'impulsion 70-100 femto s
- Fréquence de répétition 80 MHz
- Puissance moyenne 100 mW

## Image

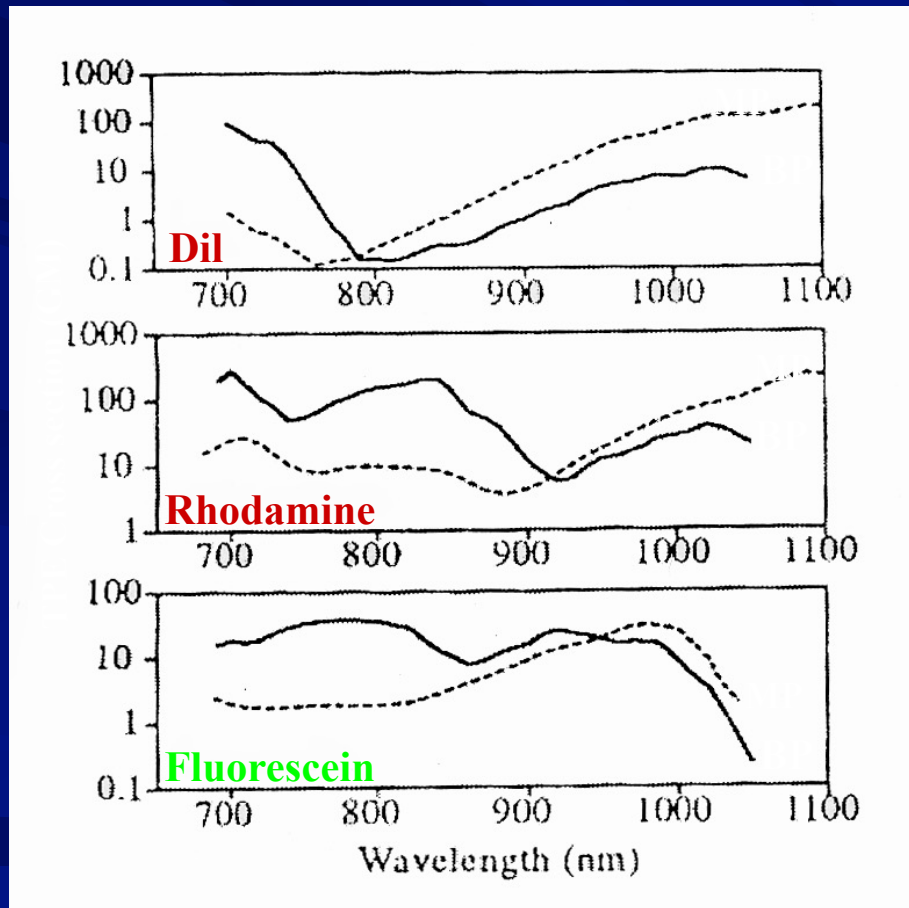
- Profondeur jusqu'à 800 microns
- Résolution radiale 0,4  $\mu\text{m}$
- Résolution axiale 0,9  $\mu\text{m}$

# Spectres d'excitation à deux photons de quelques fluorochromes courants



La gamme de longueurs d'onde excitant les fluorochromes se situe dans le proche infrarouge et s'étend de 700 à 1000 nm

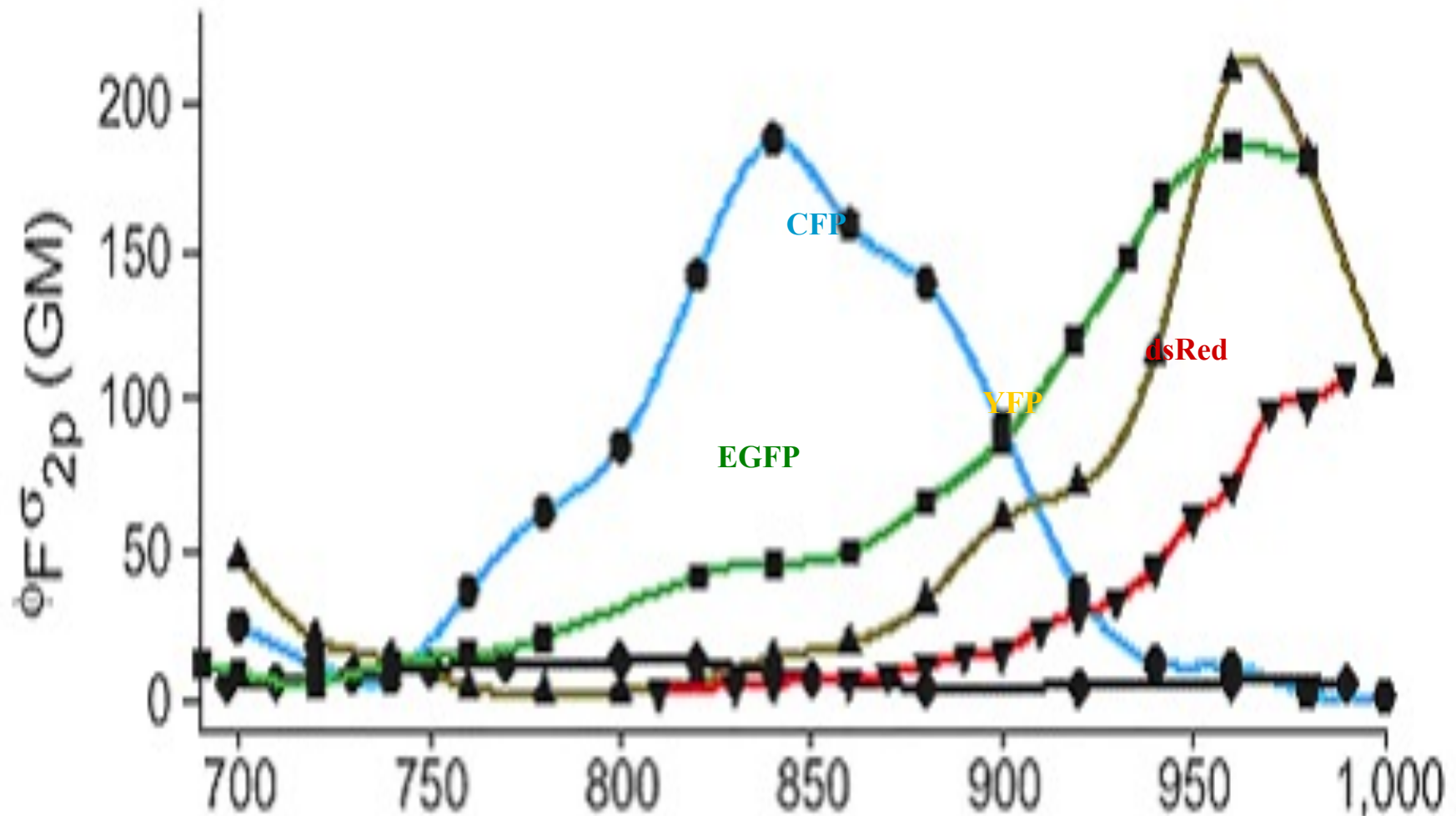
# Comparaison entre les spectres d'excitation en un et deux photons de trois fluorochromes courants



	$\lambda_{\text{abs1}}$ (nm)	$\lambda_{\text{abs2}}$ (nm)
Bodipy	503	920
Cascade Blue	400	750
DAPI	350	700
Fluorescéine	492	780
Indo-1	350	700
Lucifer Yellow	430	860
Rhodamine B	545	840
Rhodamine 6G	526	795

(Xu and Webb, 1996)

# Spectres d'excitation à deux photons de quelques protéines fluorescentes

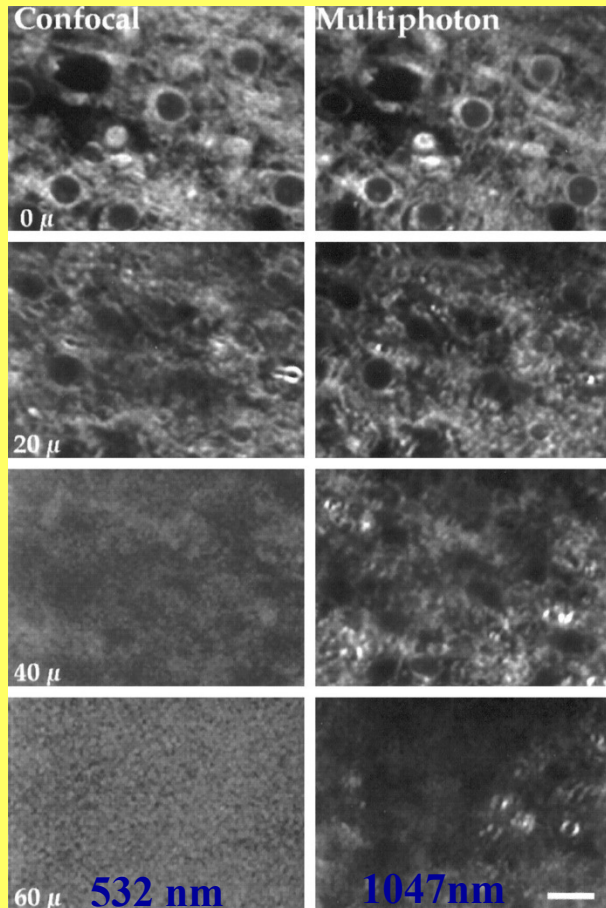




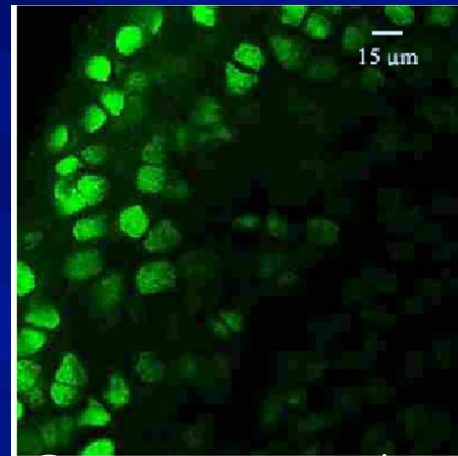
# Principaux avantages de l'excitation à deux photons

- Réduction des risques de photoblanchiment des fluorochromes situés en dehors du point focal
- La photo toxicité (chaleur, création d'oxygène singulet) est réduite au micro-volume de focalisation ce qui permet un bon maintien de la viabilité cellulaire
- Amélioration de l'épaisseur des échantillons analysables due à la meilleure pénétration des infra-rouges (I.R.) dans le matériel biologique (les I.R. diffusent moins et sont moins absorbés que le rayonnement visible)
- Collecte de la lumière plus efficace (meilleur rapport signal/bruit)
- Le laser accordable (700 à 1000 nm) rend la plupart des fluorochromes accessibles et les longueurs d'ondes d'excitation et d'émission sont bien séparées
- Meilleure localisation du photoblanchiment dans les expériences de FRAP

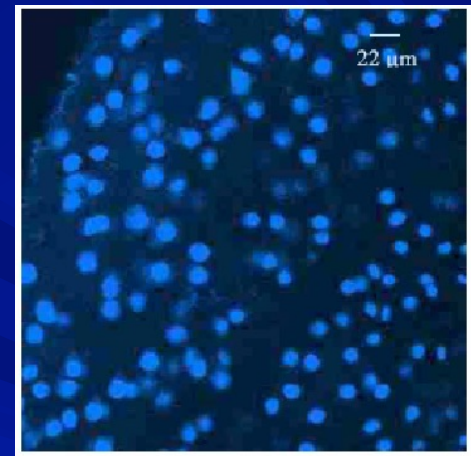
# Profondeur de pénétration dans l'échantillon : Comparaison confocal / biphoton



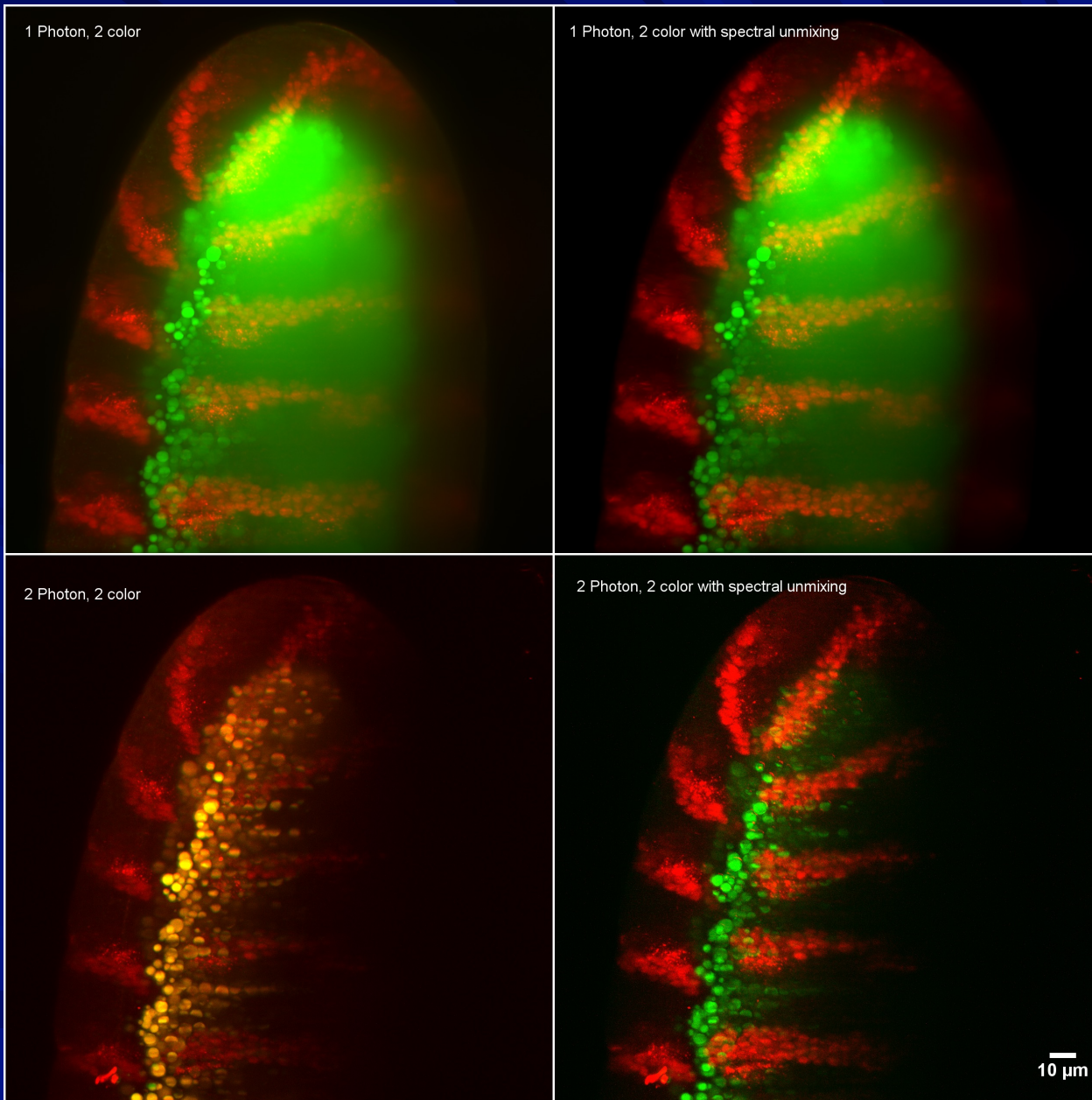
Coupes de cerveau de hamster  
marquées avec le FM 4-64  
( J. White, Biophysical journal, 1998 )



Excitation en mode  
monophotonique  
(488nm)



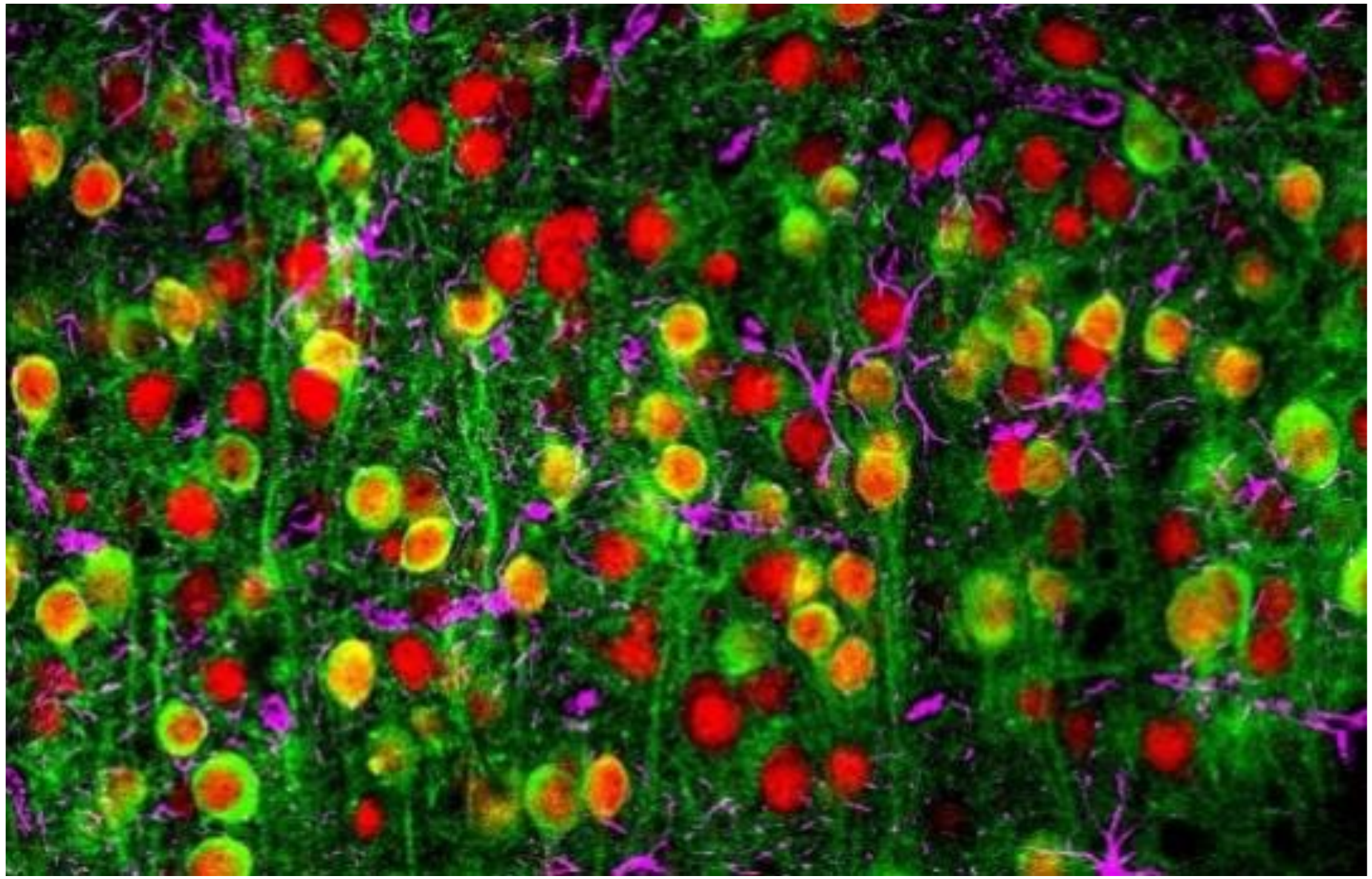
Excitation en mode  
biphotonique (720nm)

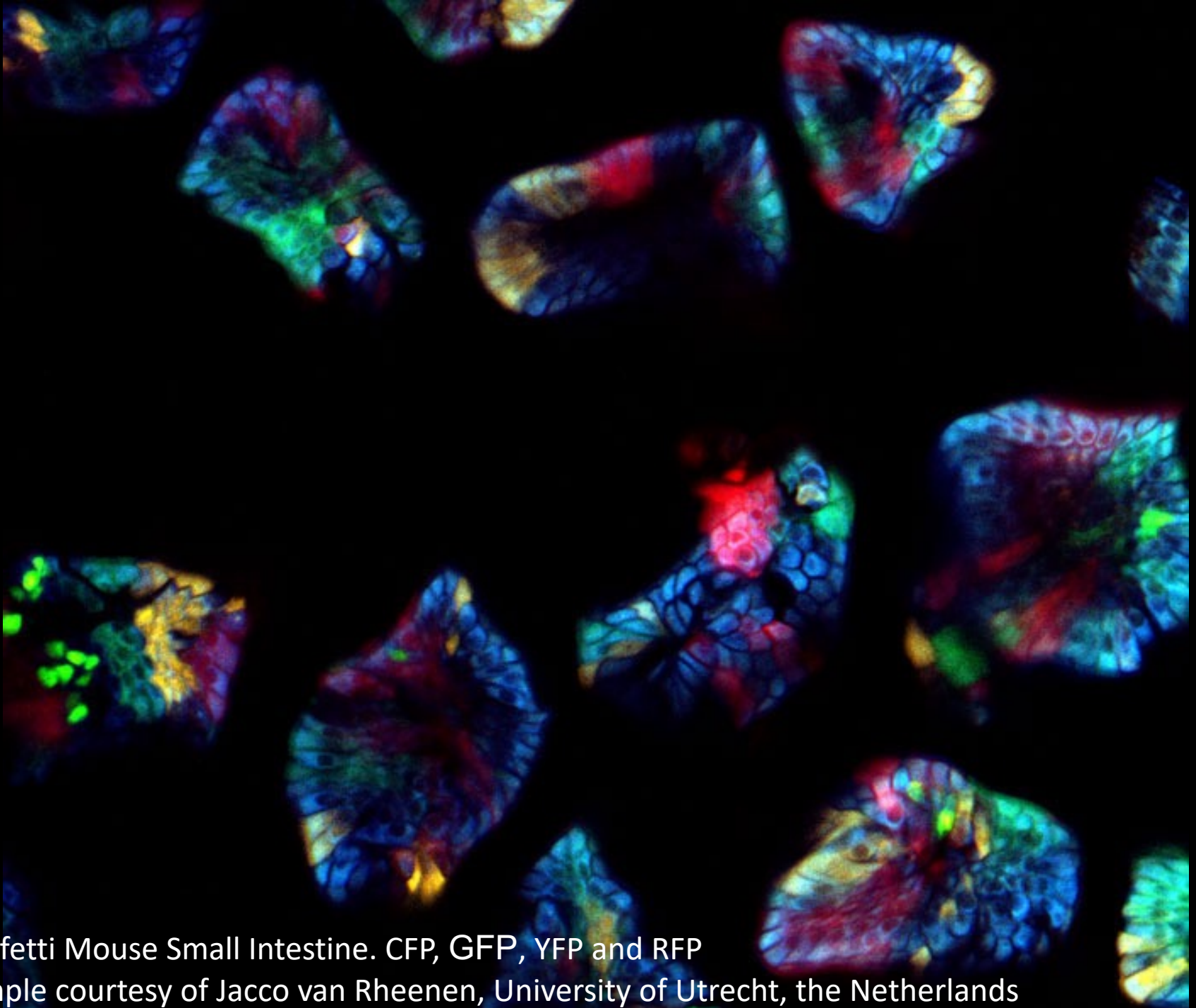


Maximum Intensity Projections of 1 Photon and 2 Photon images of stage 11 *Drosophila* embryos, immunostained for parasegments with Wingless. For better clarity the images have been spectrally unmixed.

# Quelques applications biologiques de la microscopie confocale à balayage laser à deux photons

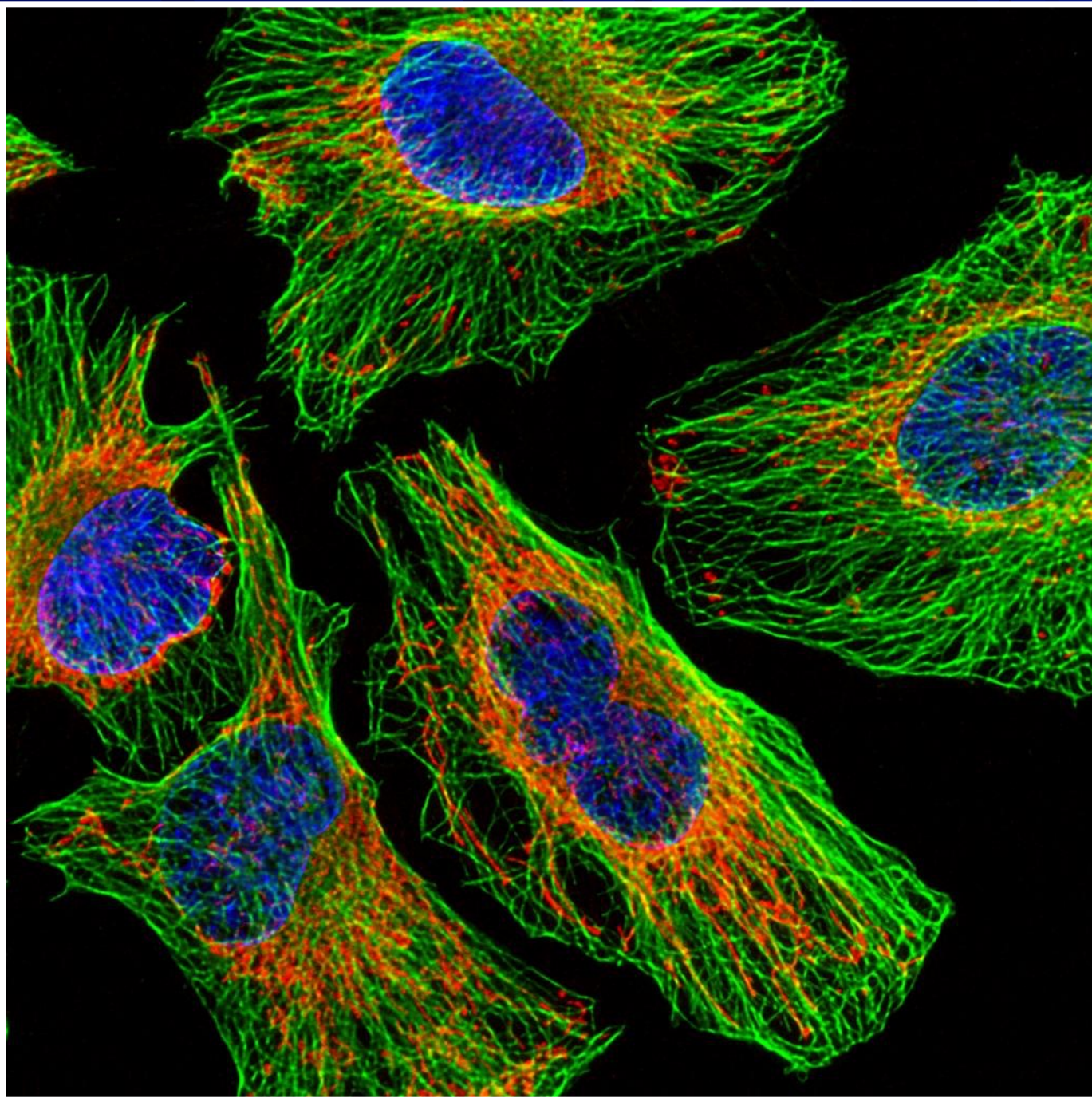
- Suivre le développement d'embryons sans dommage
- Etude de la mobilité des molécules par mesure du recouvrement de fluorescence après photoblanchiment (FRAP)
- Analyses *in-vivo* sur de petits animaux (cerveau de souris)
- Généralement, la microscopie à deux photons sera plus appropriée que la microscopie confocale pour l'étude du matériel vivant sur de longues durées et pour toute analyse sur du matériel de plus de 50  $\mu\text{m}$  d'épaisseur

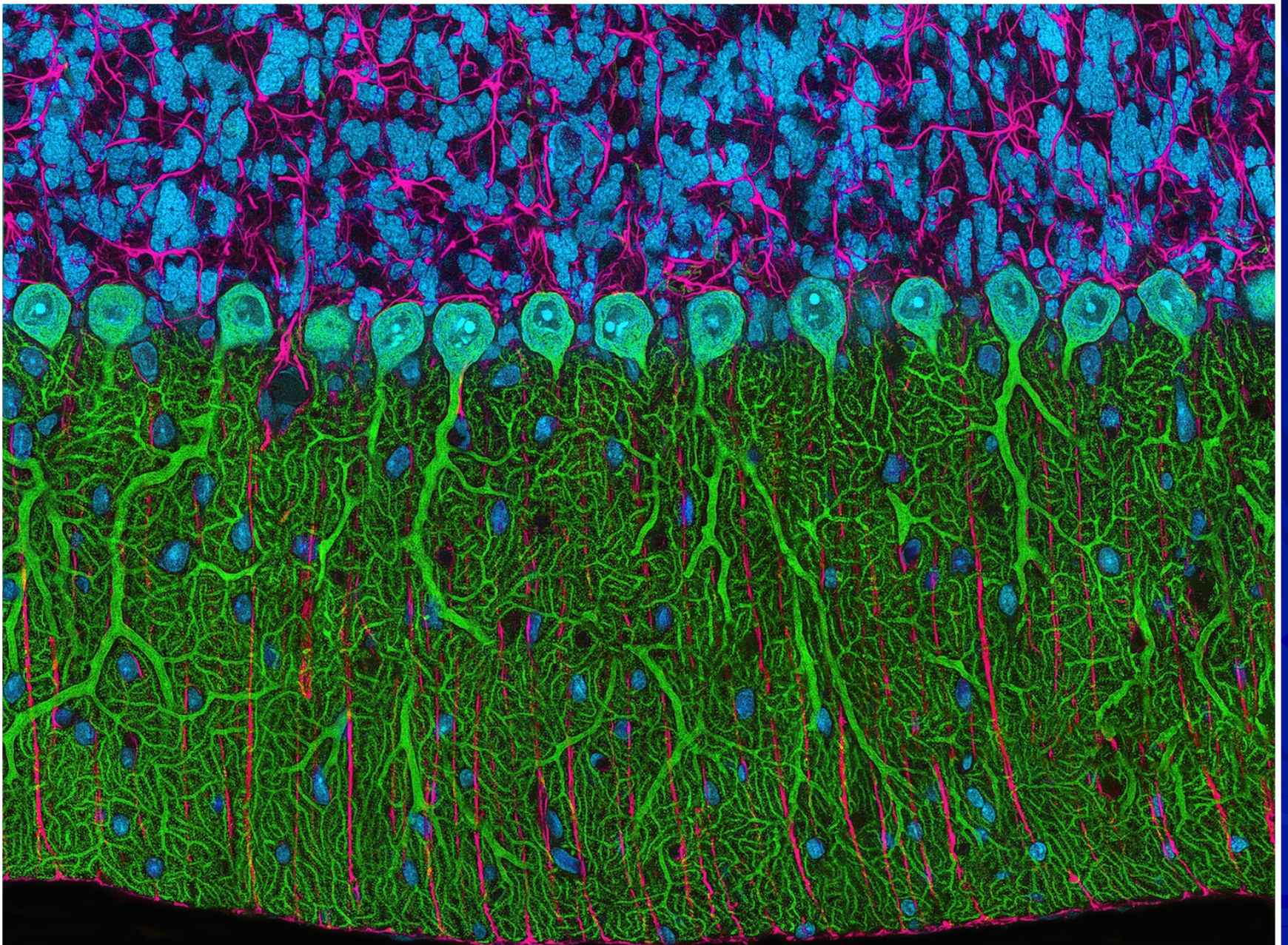




Confetti Mouse Small Intestine. CFP, GFP, YFP and RFP

Sample courtesy of Jacco van Rheenen, University of Utrecht, the Netherlands



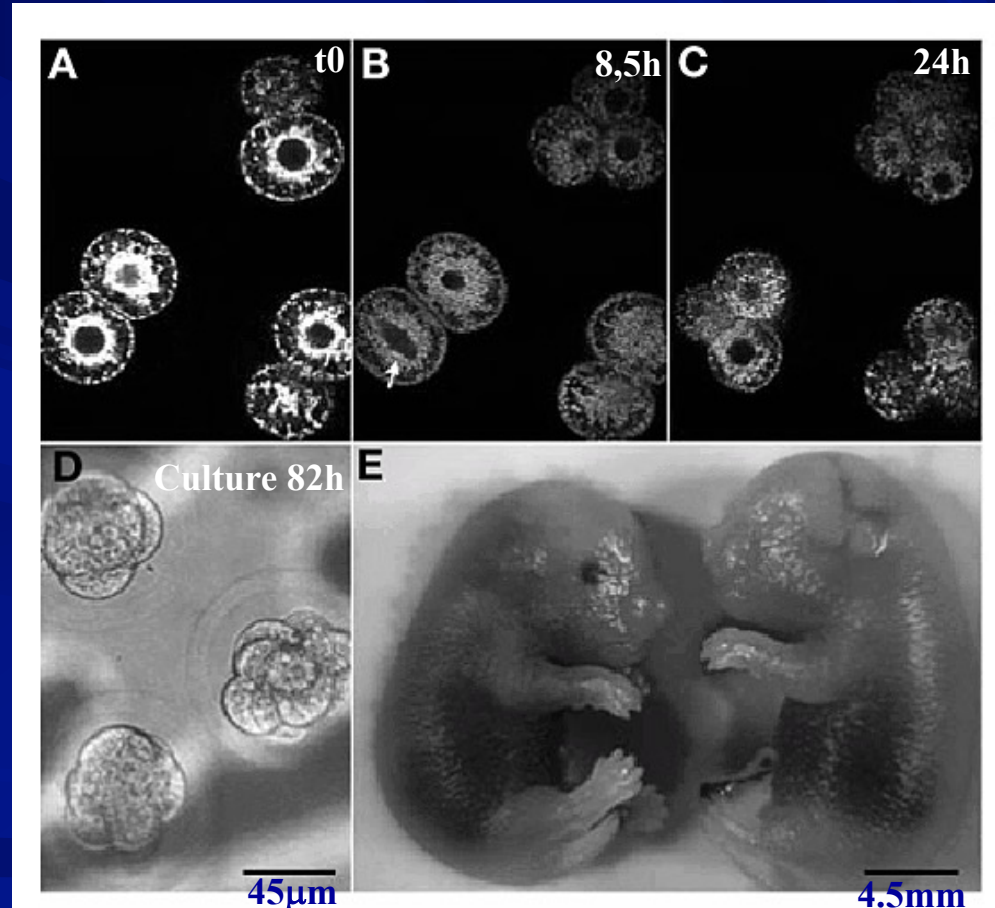


Rat brain cerebellum. Multiphoton photography, 300x. (Thomas Deerinck, National Center for Microscopy and Imaging Research, University of California)



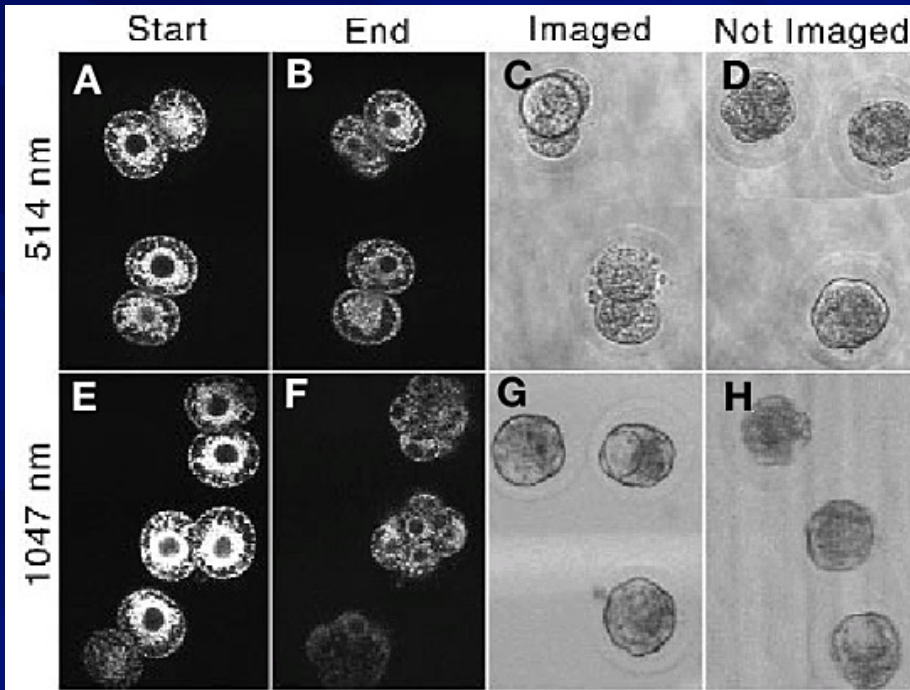
# Microscopie confocale à balayage laser à deux photons: application *in-vivo*

Suivi du développement foetal sans dommage



MDP des mitochondries d'embryons de hamster marquées au « mitotracker » à différents stades du développement (Squirrell et al., 1999, Nature Biotechnology)

# Photo-toxicité réduite : préservation de la viabilité

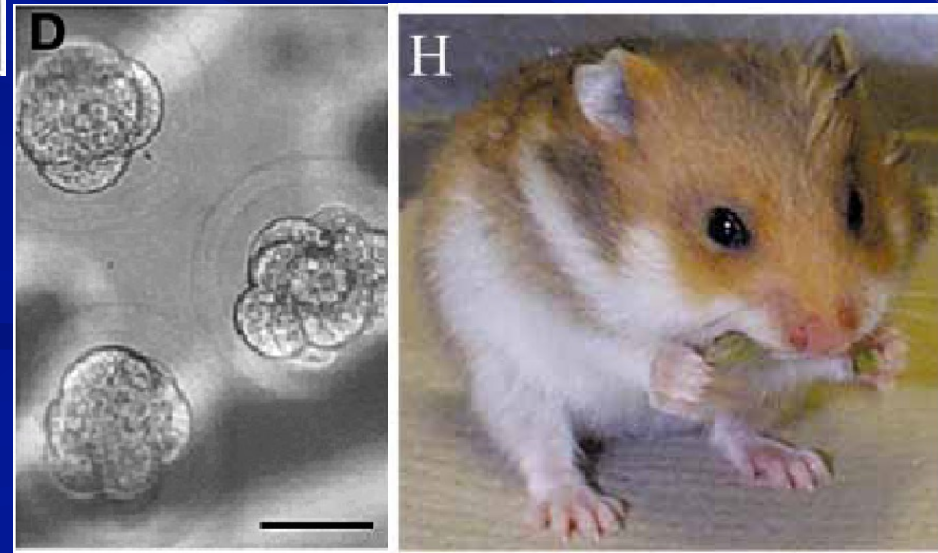


Développement *in-vitro* d'embryons de hamster, marquage au mitotracker

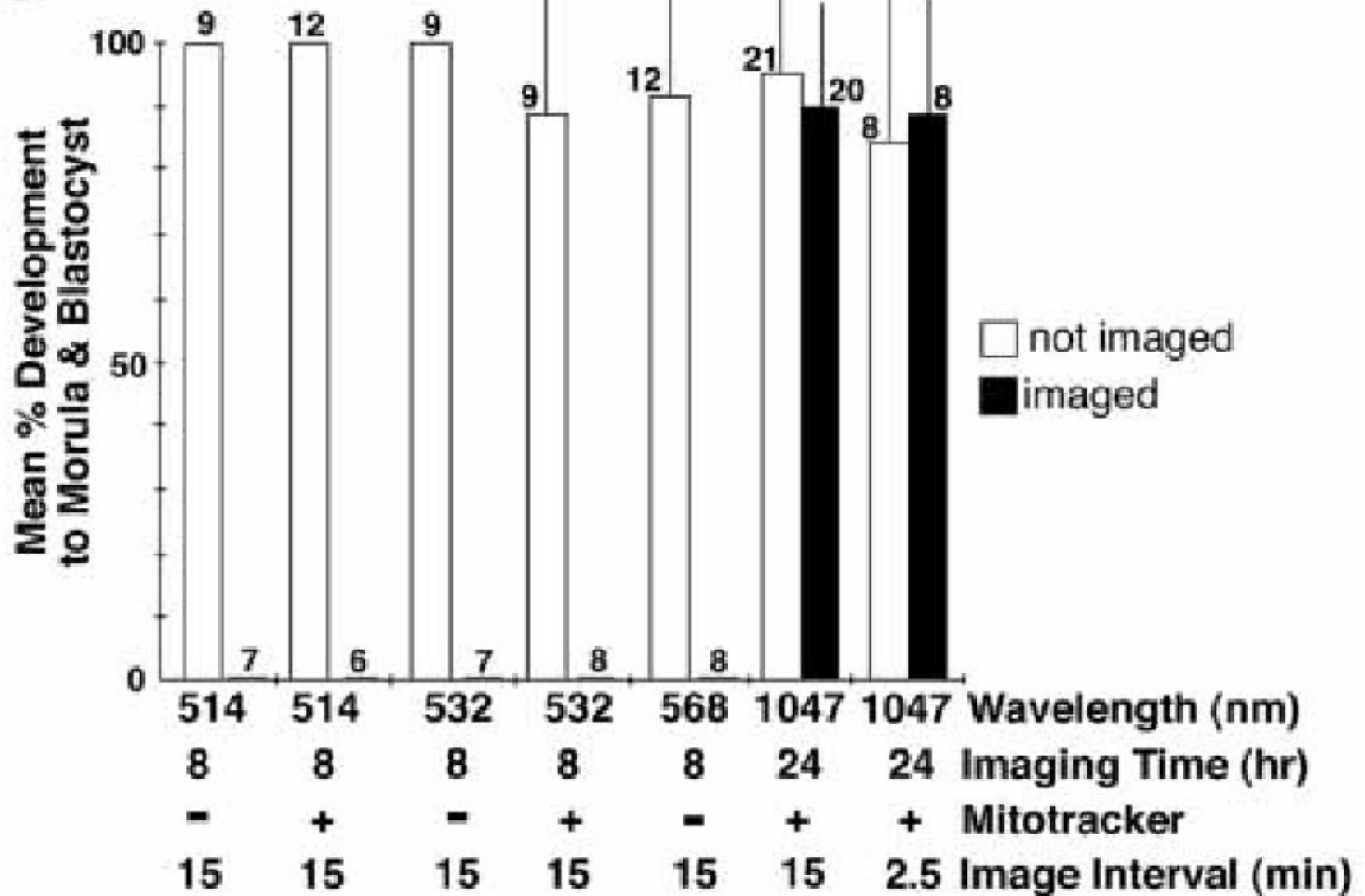
Analyse sur 24 heures  
Intervalles : 2,5 ou 15 min

From Squirrel  
et al., 1999

Réimplantation des  
blastocystes

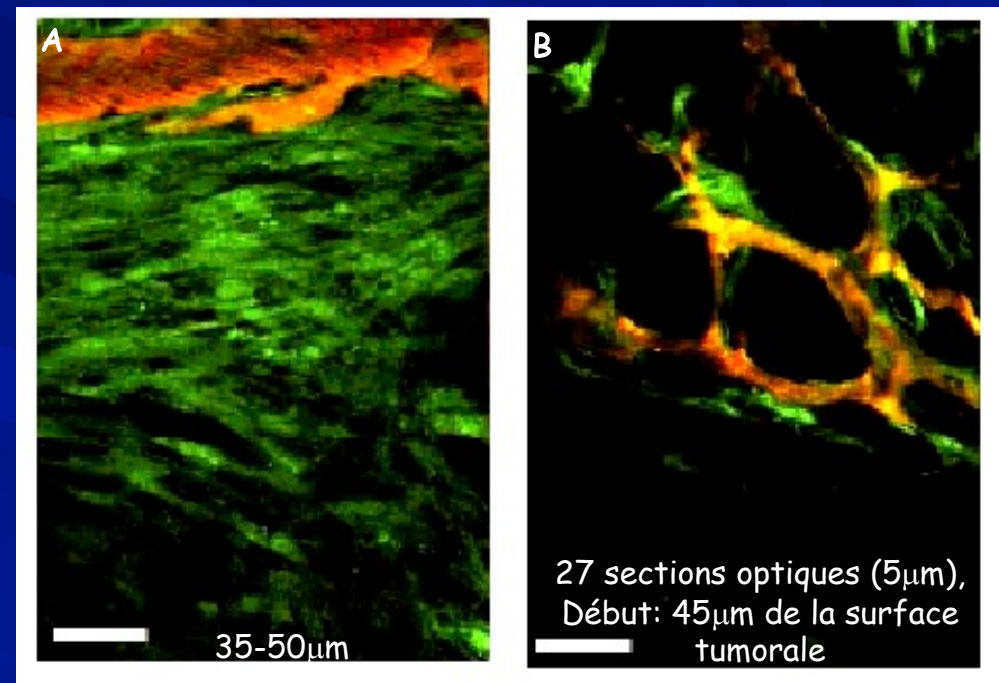
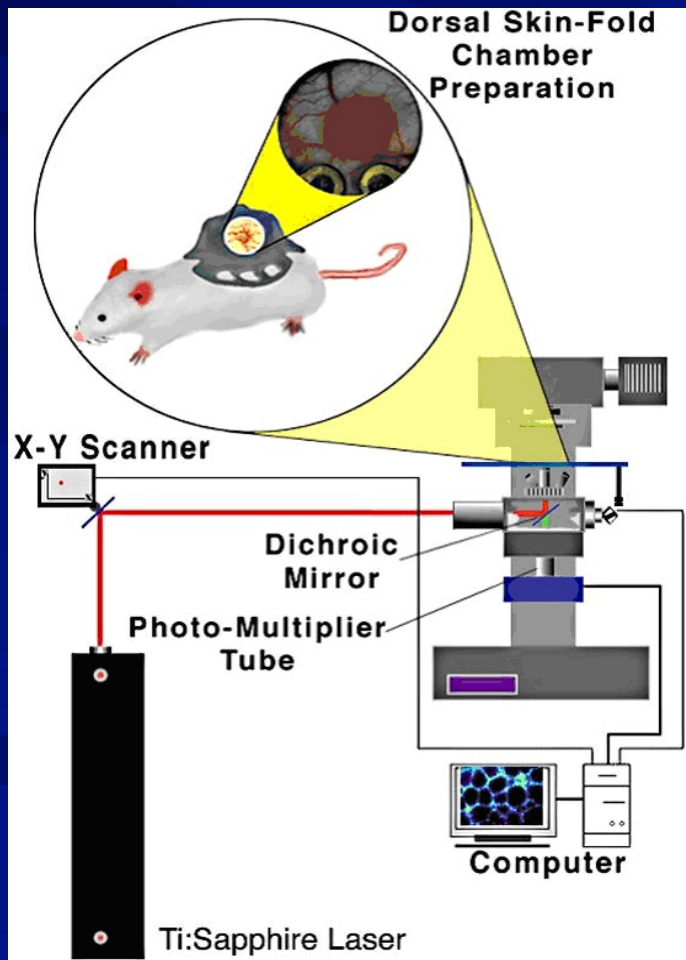


**G**

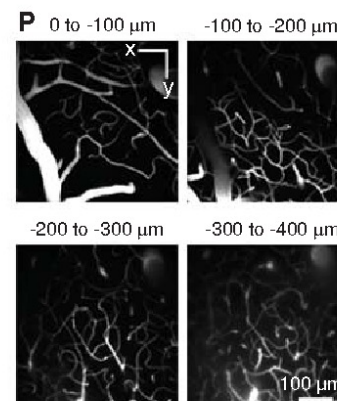
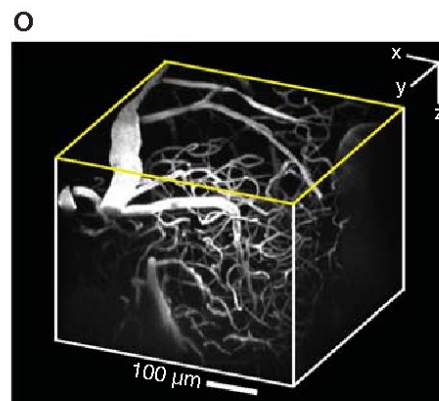
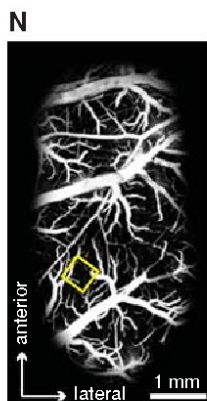
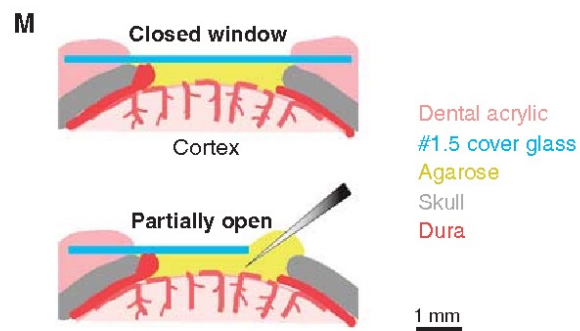
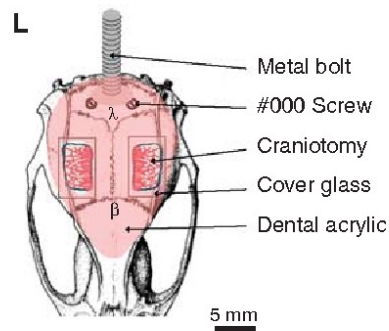
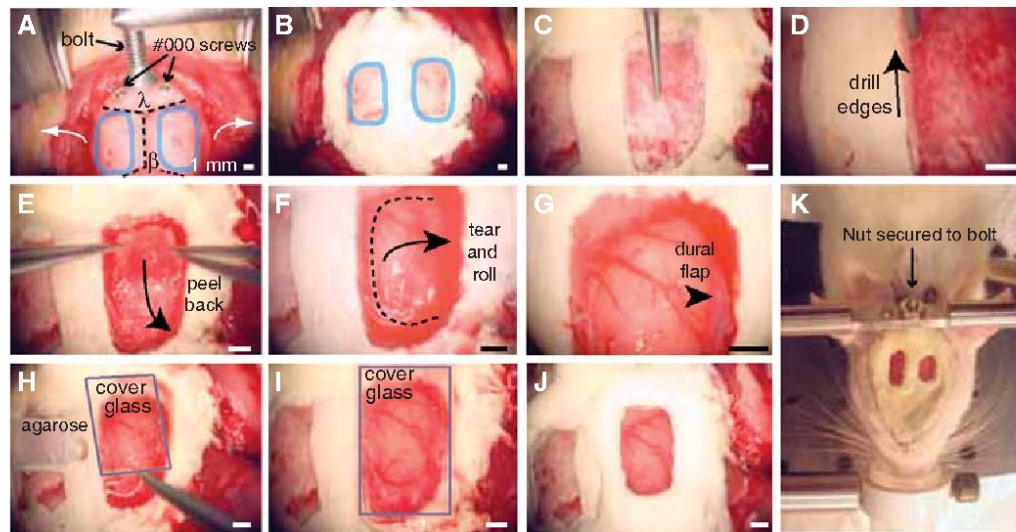


# Microscopie confocale à balayage laser à deux photons: application *in vivo*

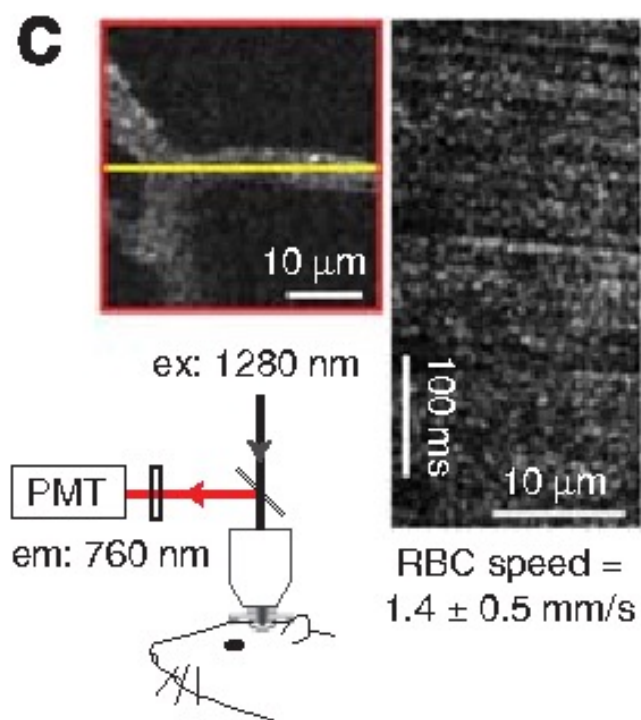
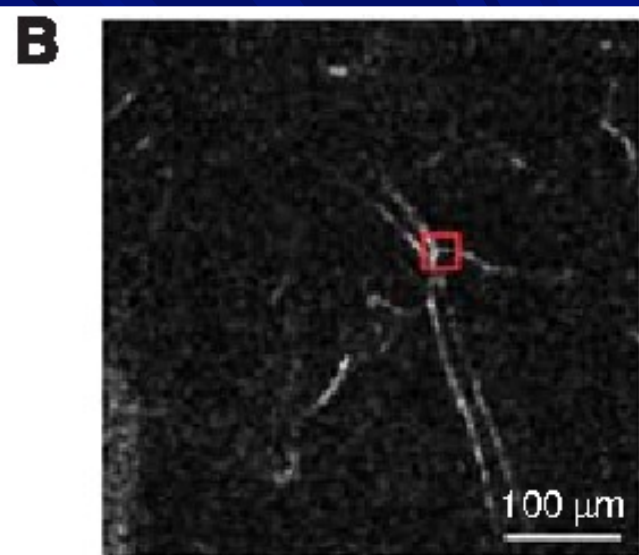
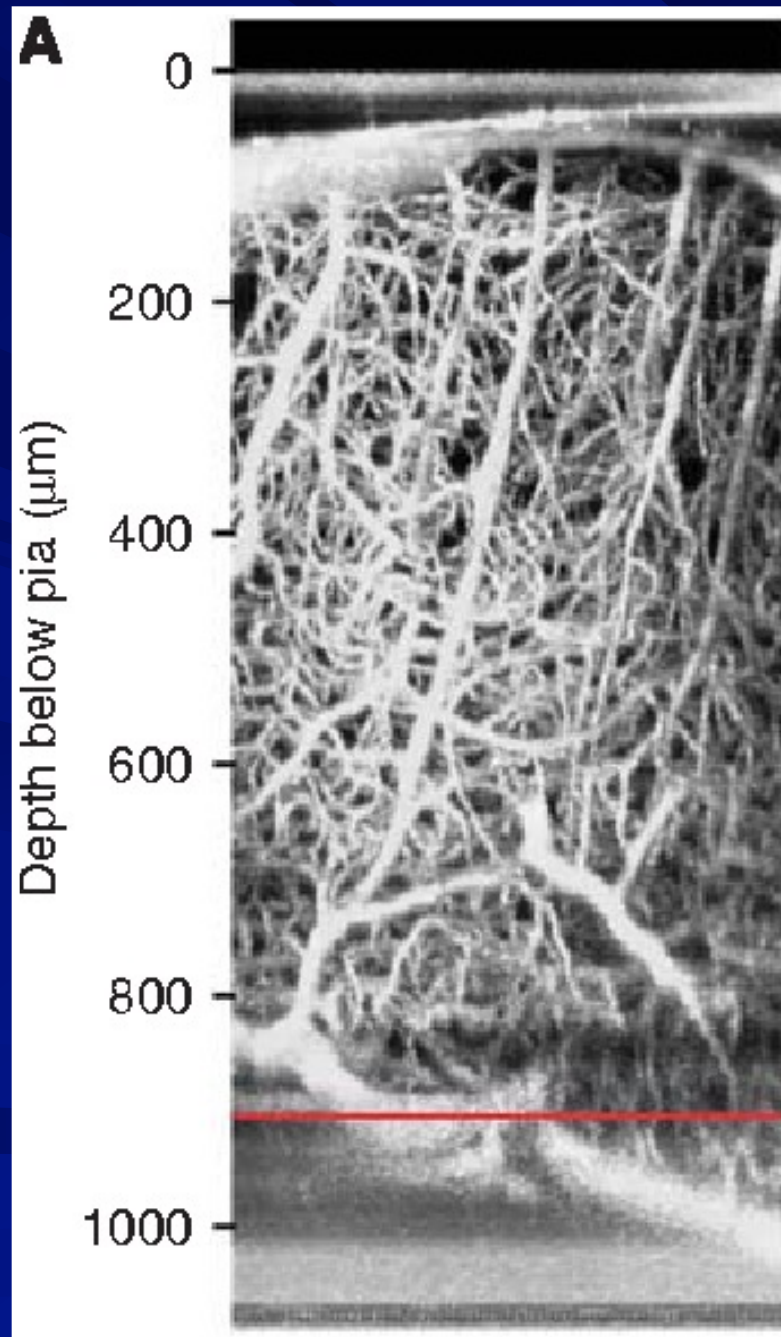
Mesure *in-vivo* de l'expression des gènes et de la microcirculation intra-tumorale

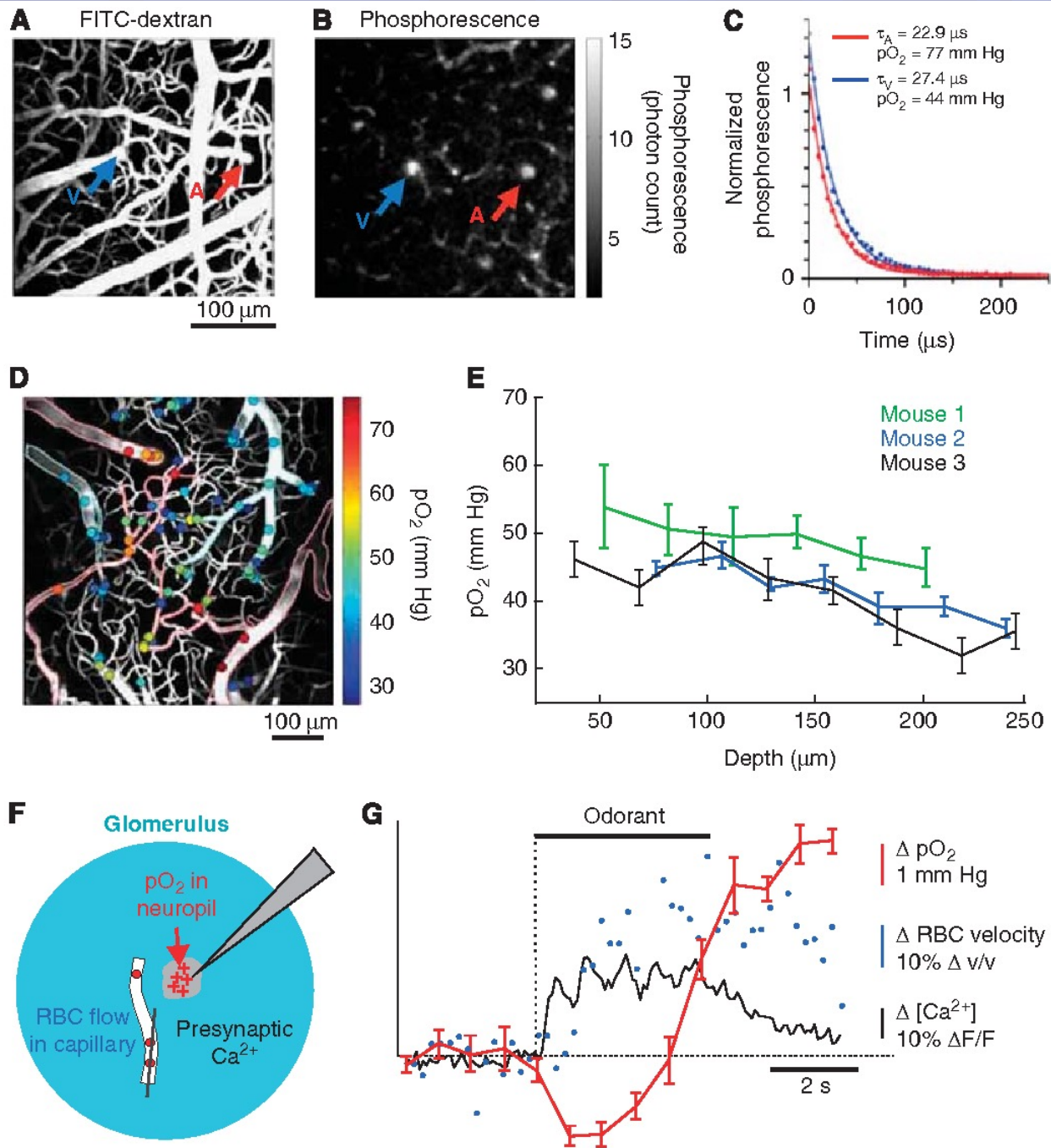


MDP dans une région tumorale chez une souris transgénique exprimant la EGFP sous le contrôle du promoteur du VEGF (vascular endothelial growth factor) (Brown et al., 2001, Nature Medicine)



Procedure for rat dura removed craniotomy. (A - K) Images of various stages in the procedure for generating an





ring of intravascular partial pressure of oxygen. The mouse cerebral vasculature was imaged through

# Application : imagerie *in vivo*, en profondeur et à haute résolution

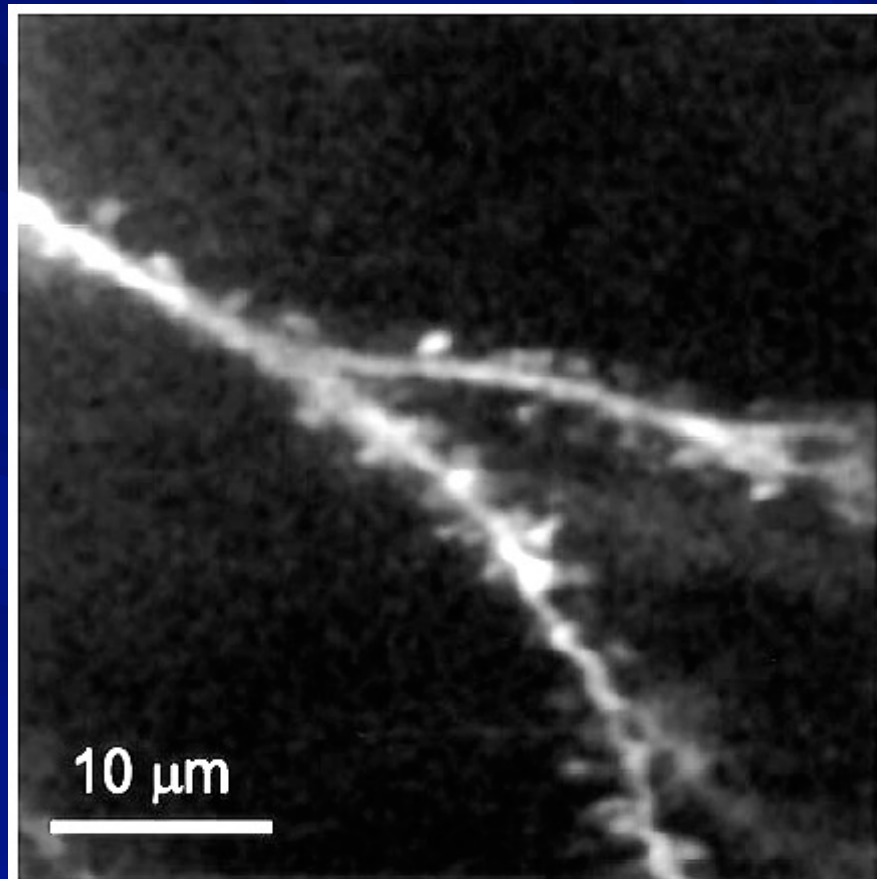
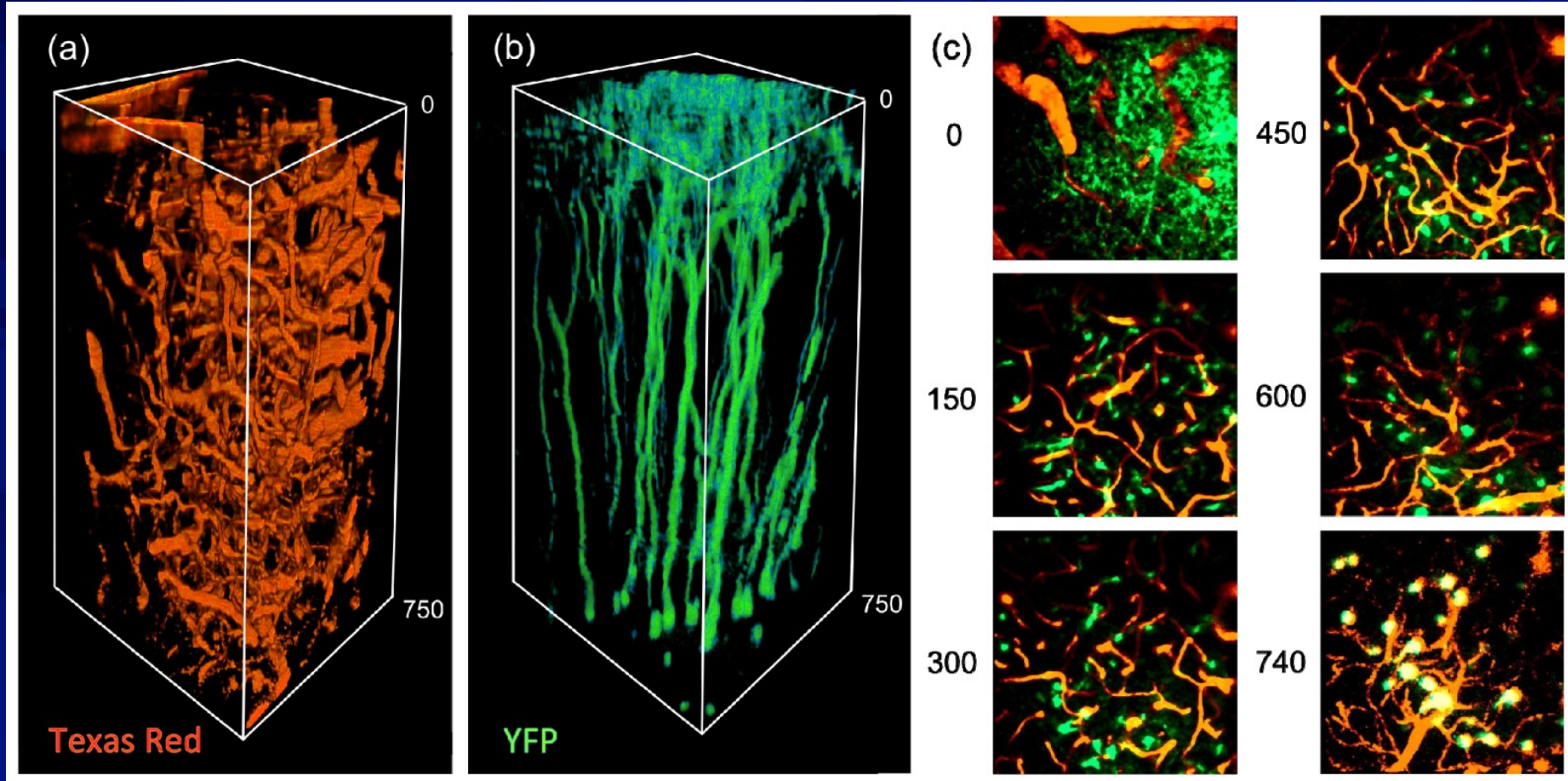


Figure 5. High Resolution Imaging In Vivo

A neocortical pyramidal neuron in layer 2-3 of the rat somatosensory cortex was filled iontophoretically with Calcium Green 1. Shown is a basal spiny dendrite approximately 200  $\mu\text{m}$  below the pial surface (K. S., W. D., D. Kleinfeld, and D. Tank, unpublished data). The excitation source was a Ti:sapphire laser (840 nm wavelength).

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





(a and b) Image stack of dimensions  $400 \times 400 \times 750 \mu\text{m}^3$  taken with two-photon laser scanning microscopy labeling for (a) microvasculature with Texas Red, and (b) Neurons expressing YFP. (c) 2D z-projections at various depths through the stack, the image at each plane is a maximum intensity projection of the nearest  $10 \mu\text{m}$ .

0.0 mm

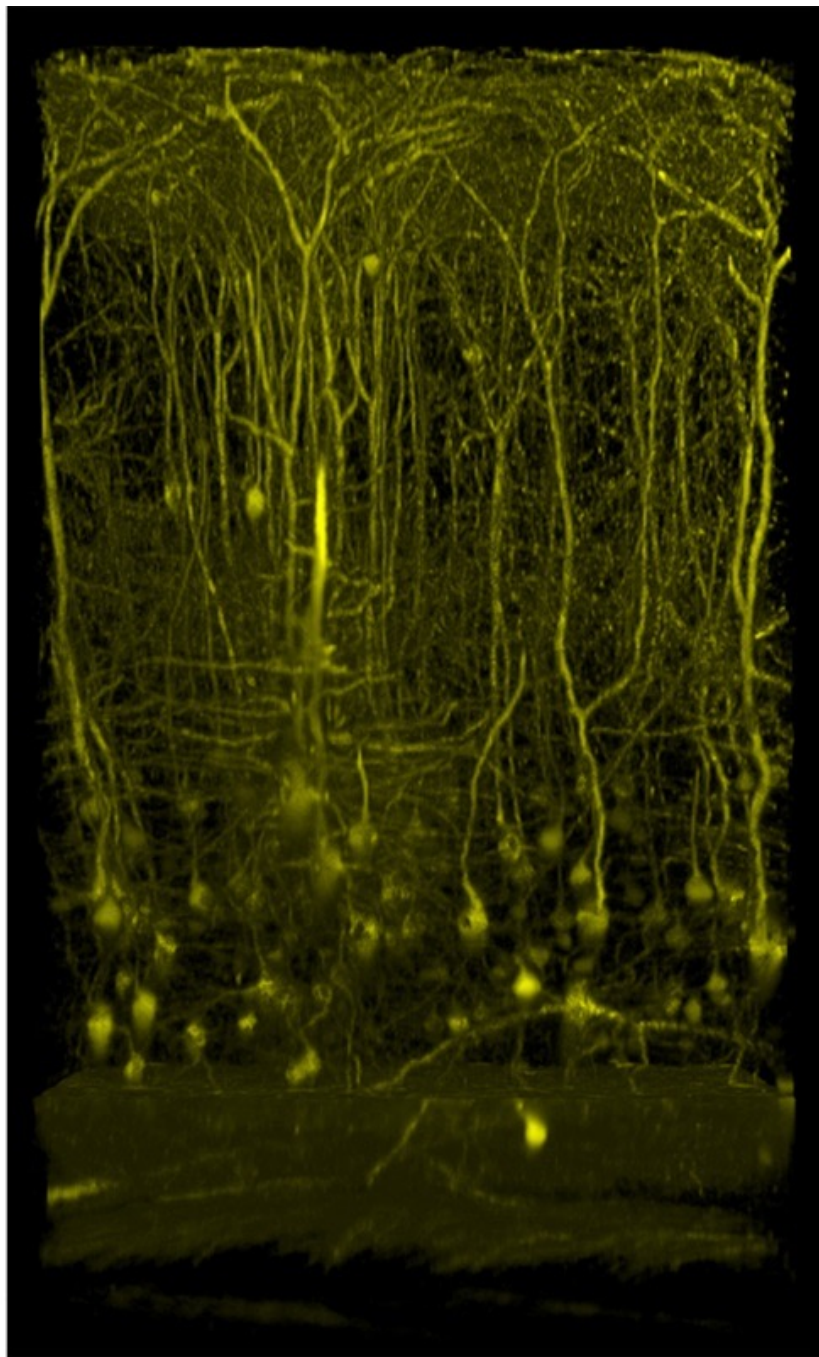
0.2 mm

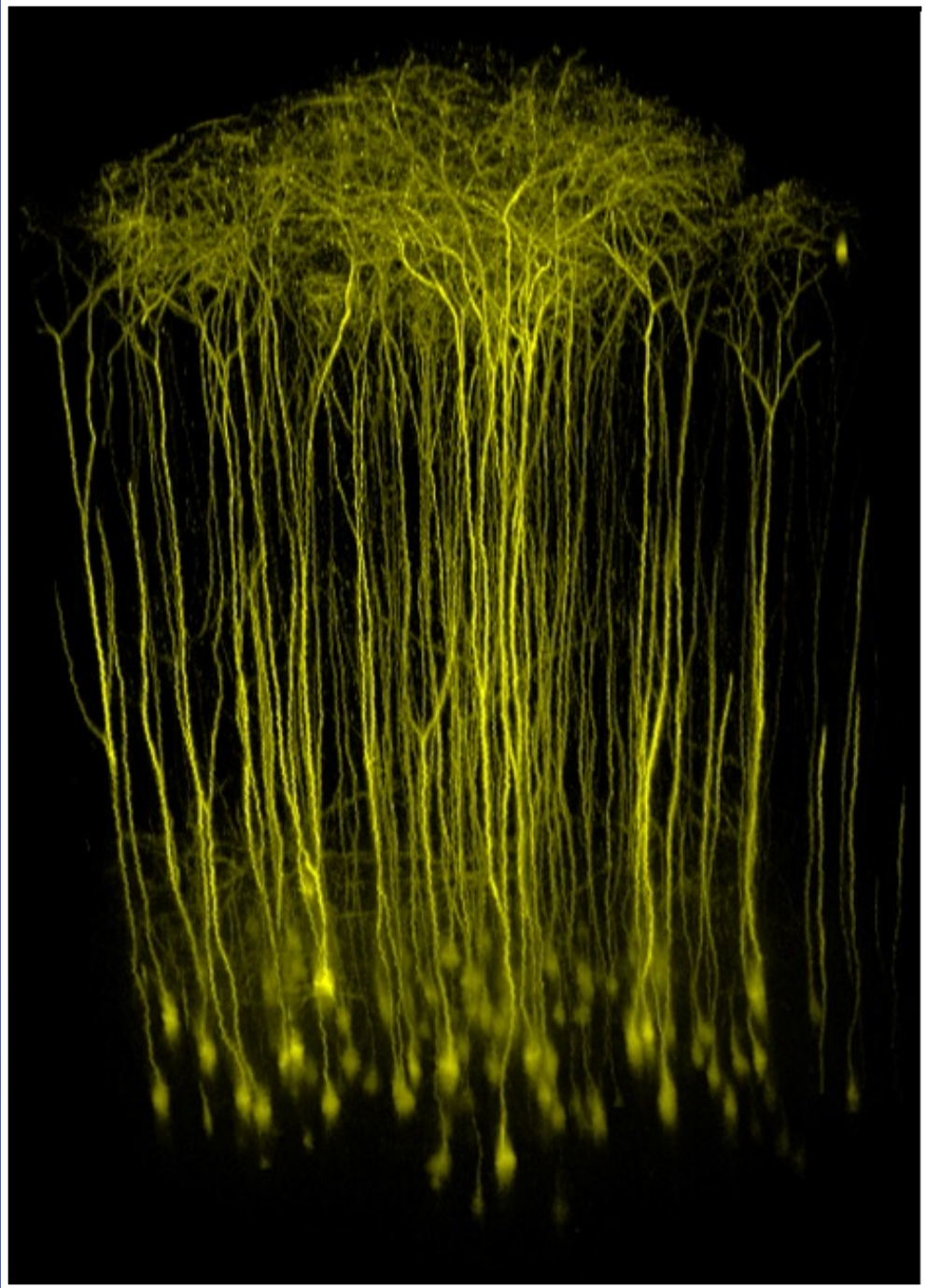
0.4 mm

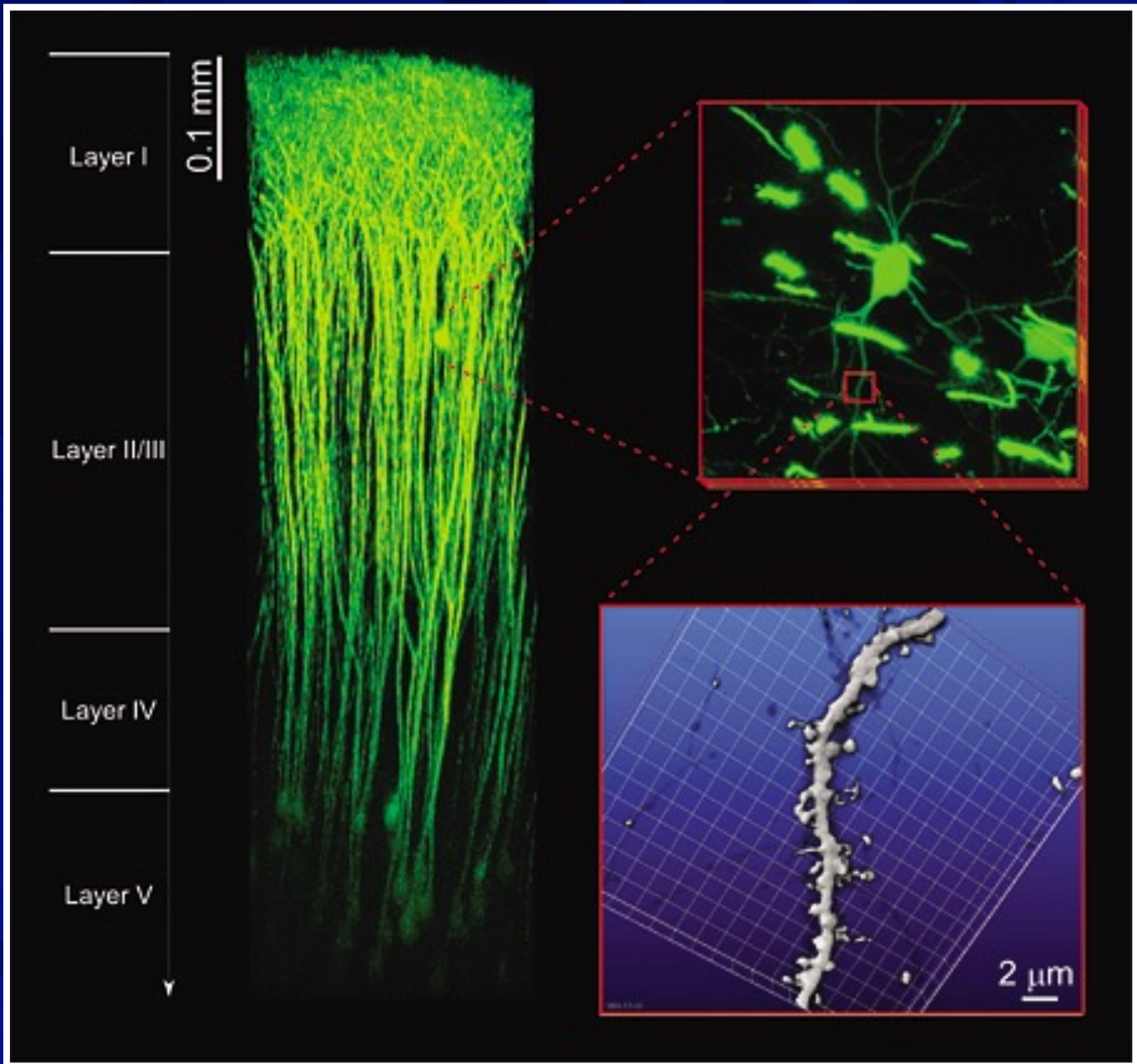
0.6 mm

0.8 mm

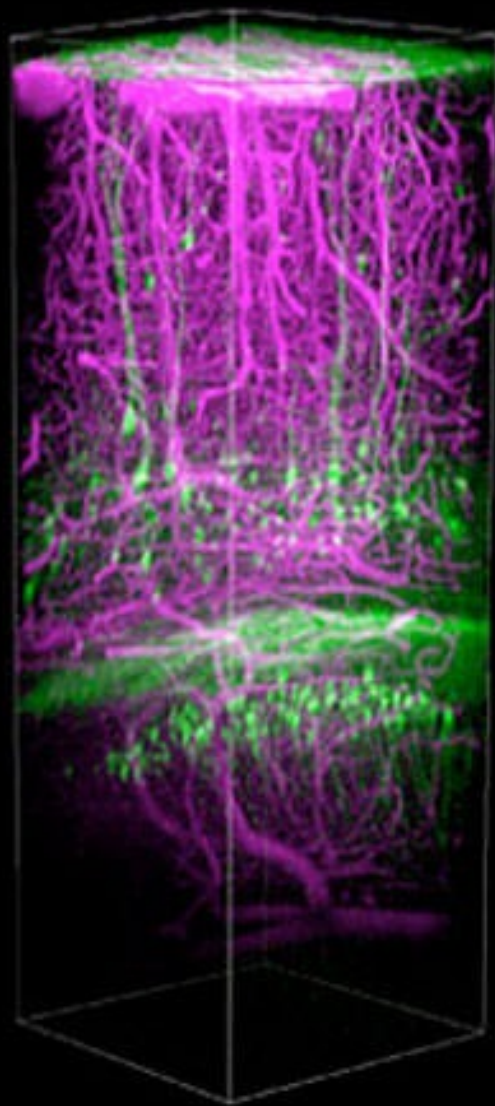
1.0 mm







"in vivo" two-photon microscopy. The superior tissue penetration of our newly constructed "in vivo" two-photon microscopy can visualize neural activities

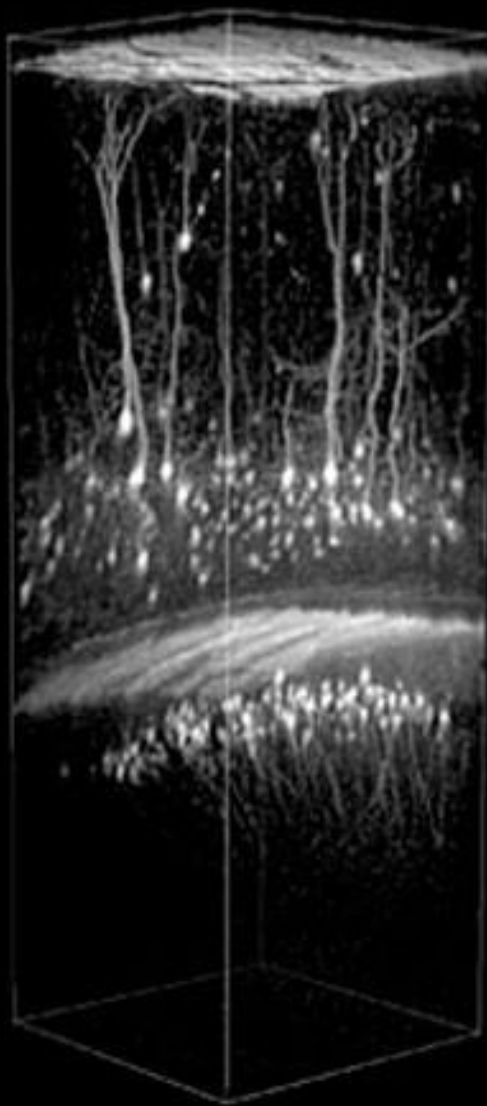


0 mm

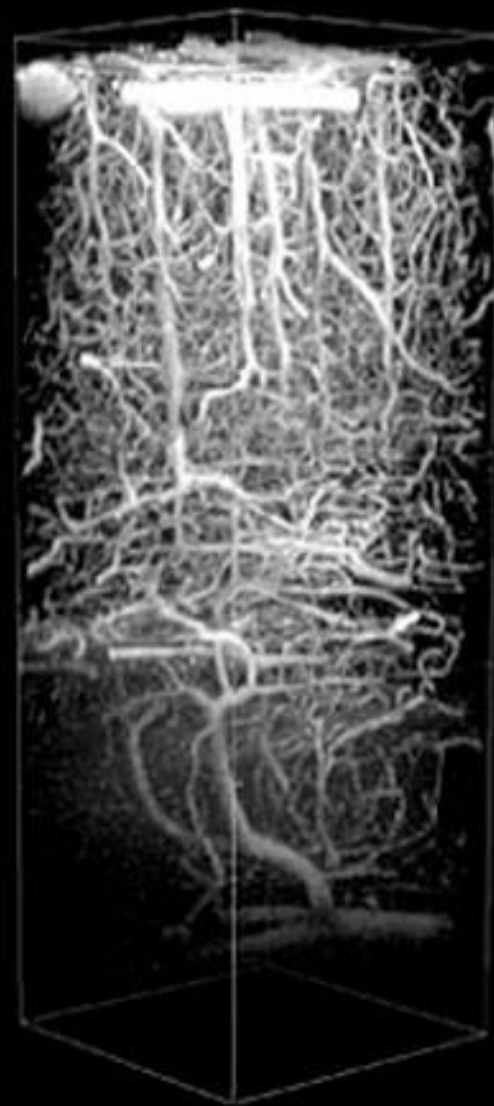
0.5 mm

1.0 mm

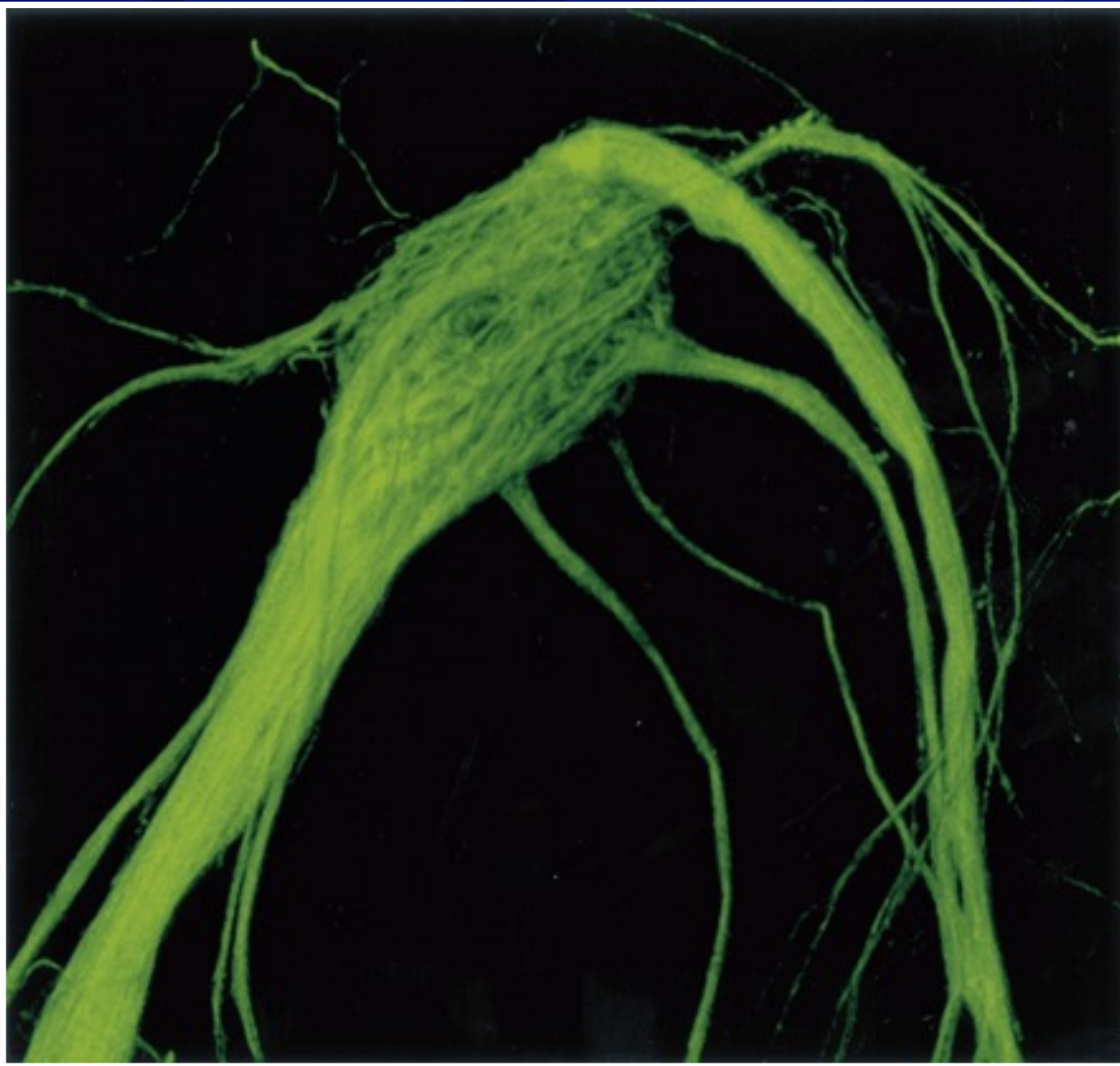
1.5 mm



YFP

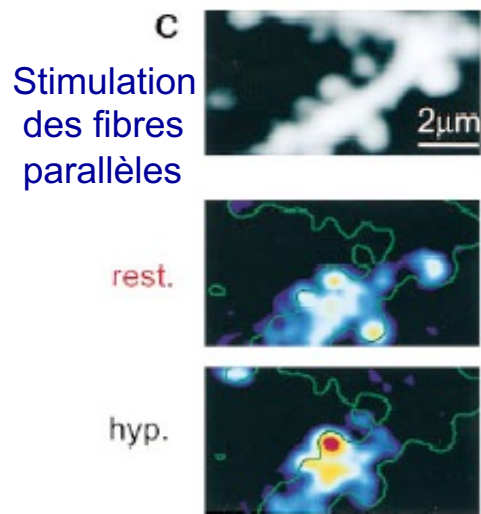
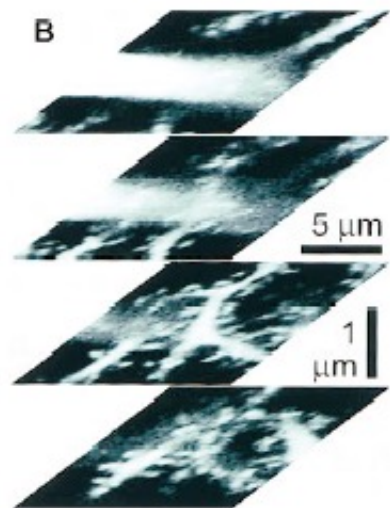
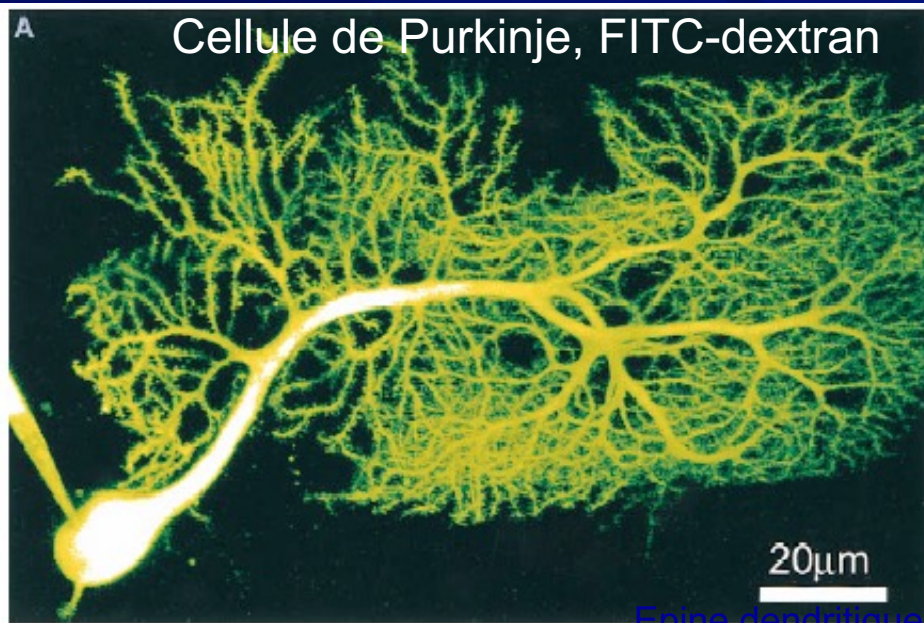


Alexa594

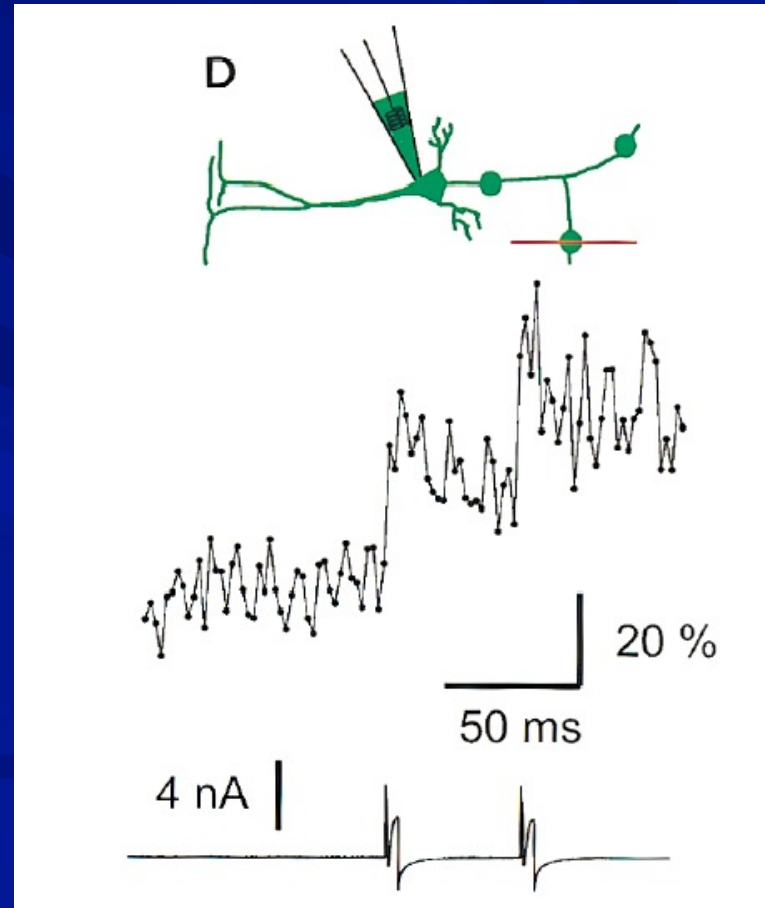


An image taken with a two-photon microscope of a neuron from the brain of a mouse. (Journal of Neuroscience)

# Application : imagerie *in vivo*, en profondeur et à haute résolution

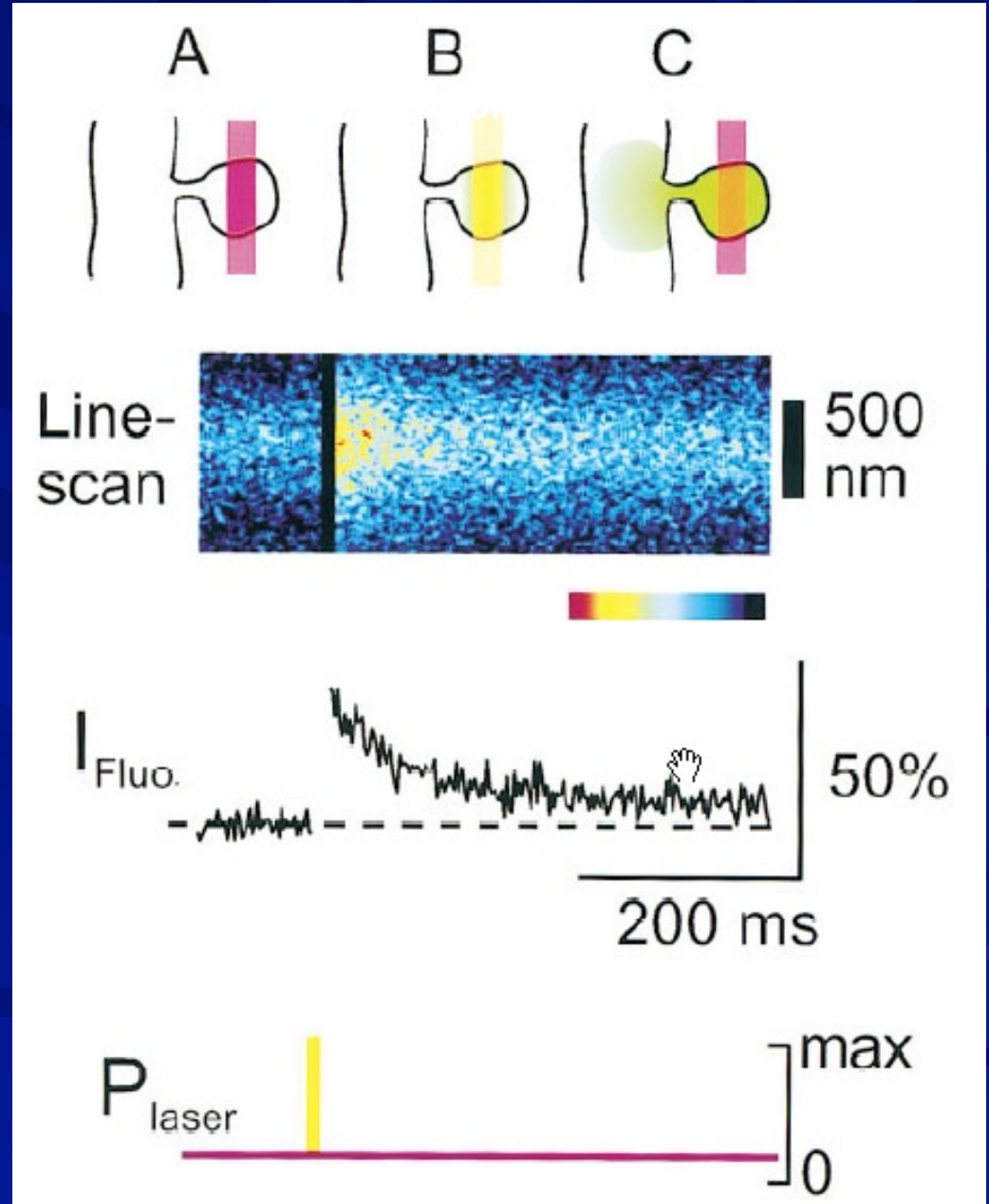


Dynamique calcique, terminaison présynaptique, cellule pyramidale du néocortex



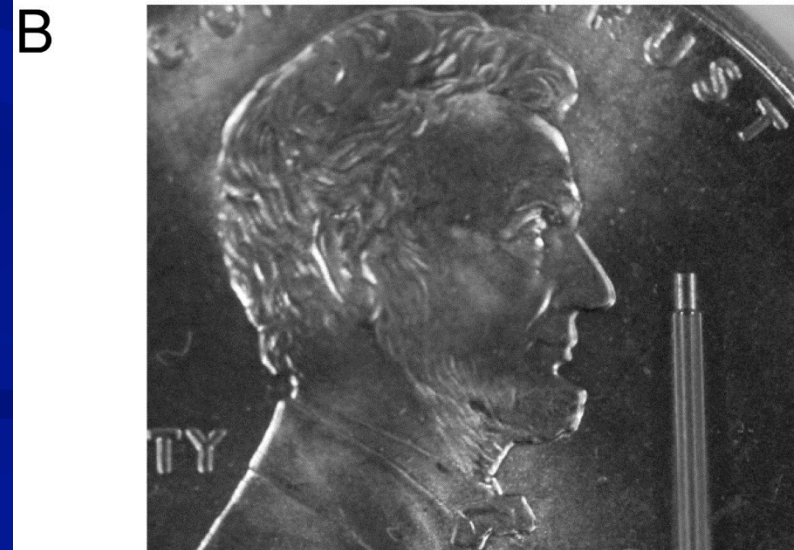
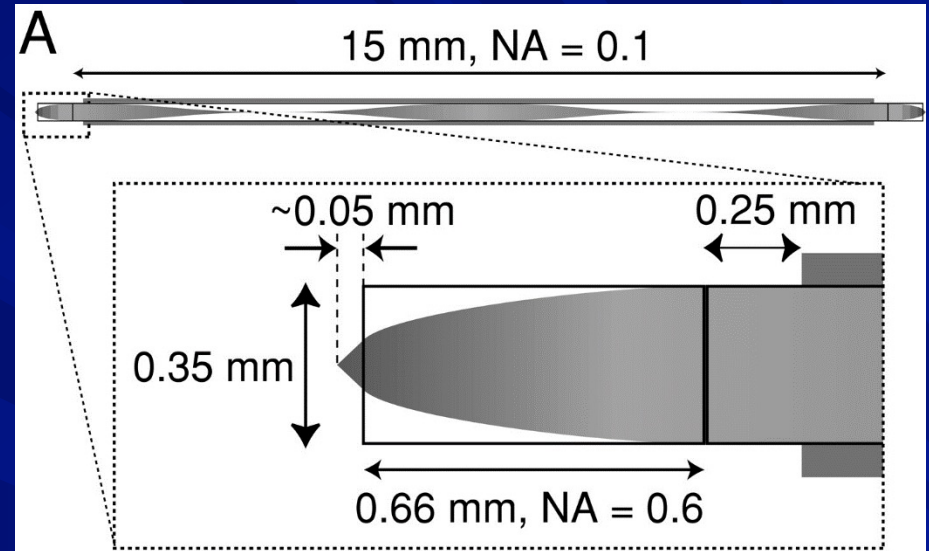
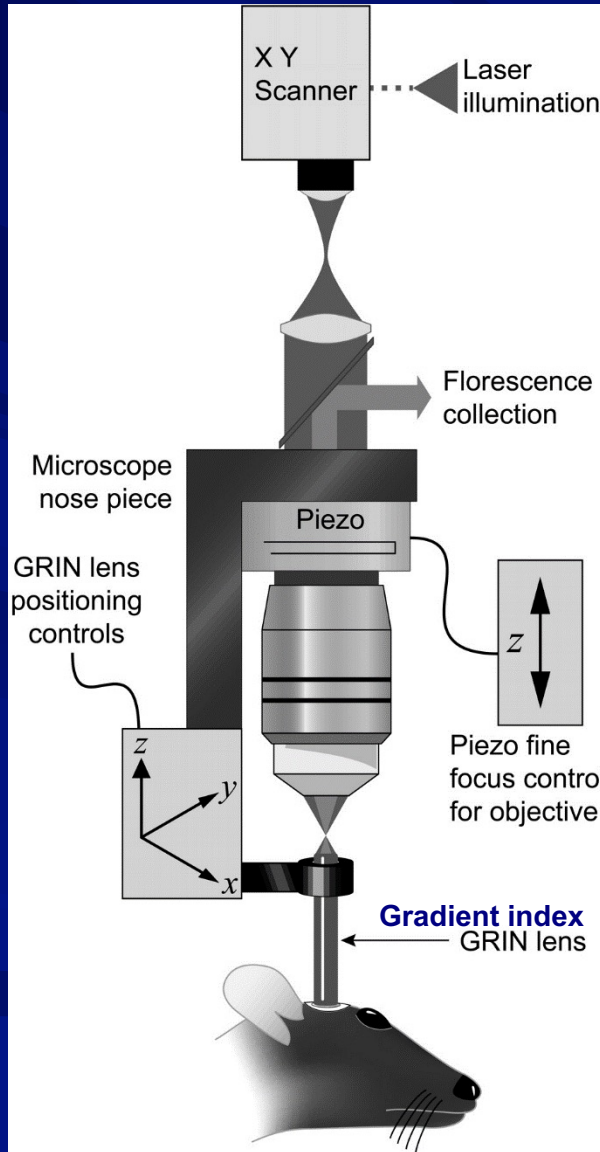
# Application : décageage de molécules

Tranche de cervelet.  
Cellule de Purkinje,  
injectée fluorescéine dextran  
cagée.  
Epines dendritiques.  
Mesure de la diffusion de  
petites molécules au travers  
du col des boutons  
synaptiques



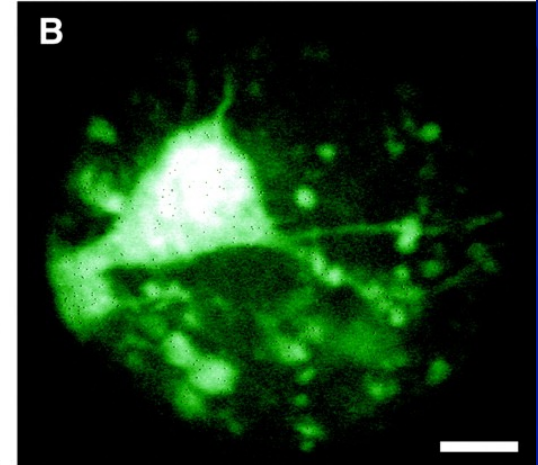
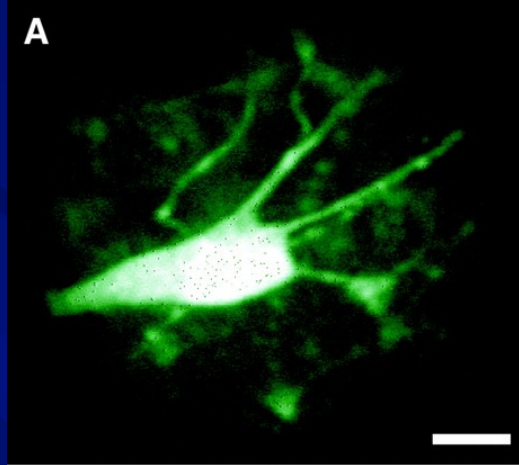


# Microscopie multiphotons dans le cerveau, en profondeur

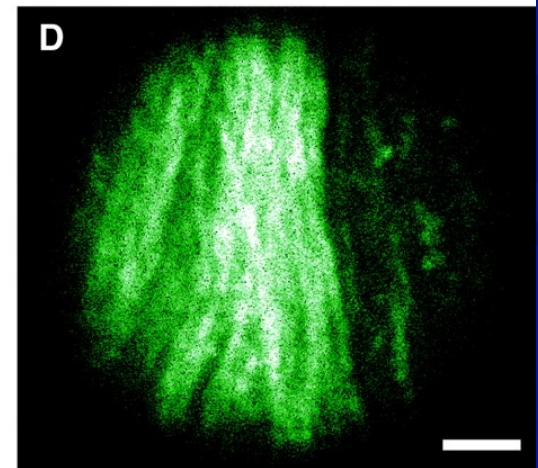
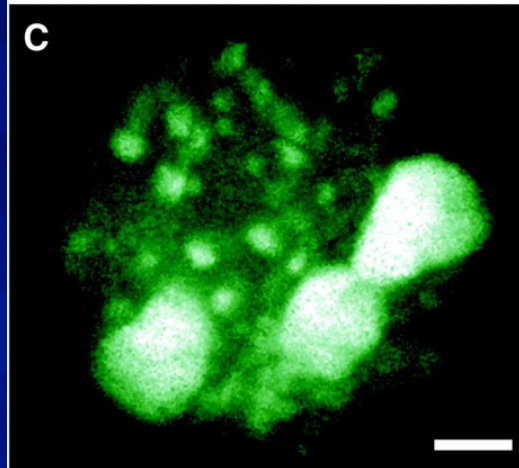


# Souris Thy1-YFP

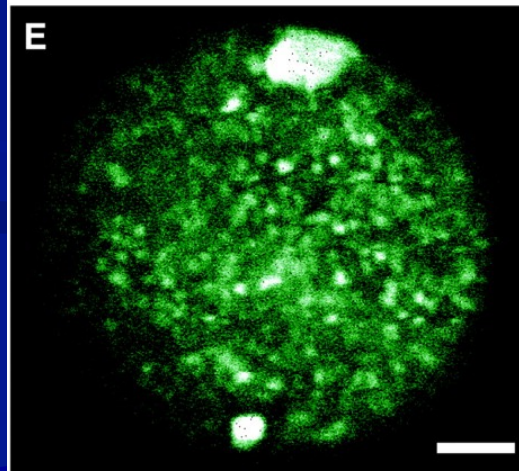
A – C : Neurones de la couche V du cortex, 700 à 800  $\mu\text{m}$  sous la surface



D : Faisceau d'axones de la capsule externe, 1 mm sous la surface

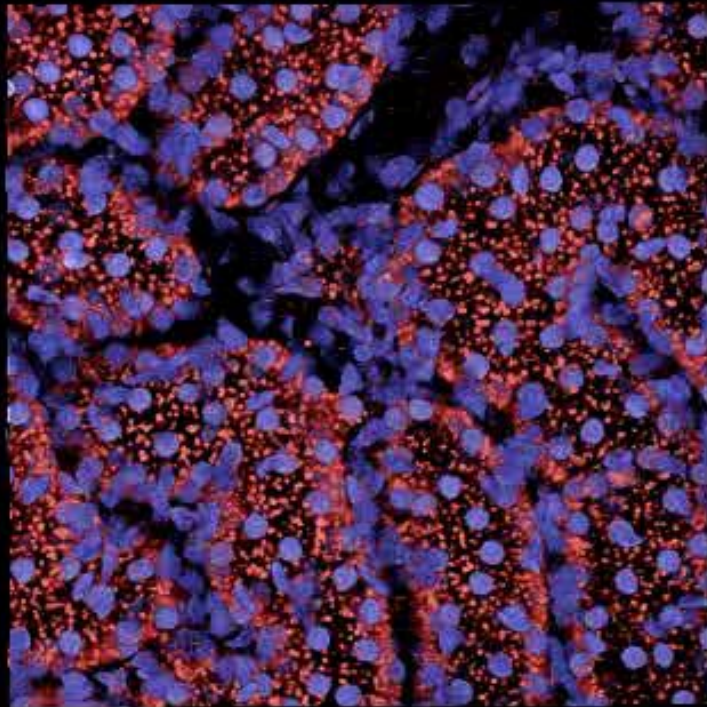


E : Neuropile, région CA1 de l'hippocampe, 1,5 mm sous la surface



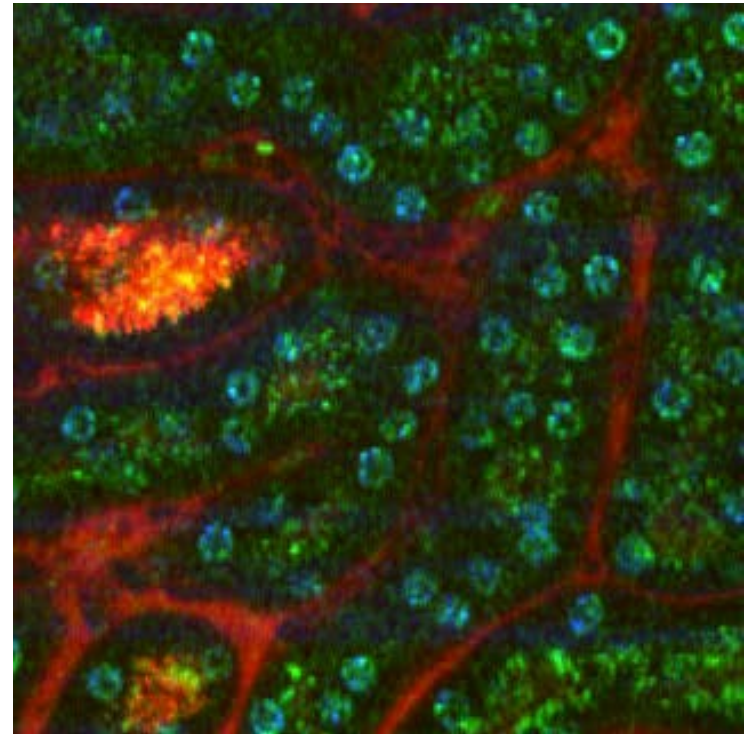
# Application : Imagerie intravitale *in vivo* à haute résolution

Imagerie fonctionnelle du rein chez l'animal vivant



Injection iodure de propidium  
et Hoechst 33342

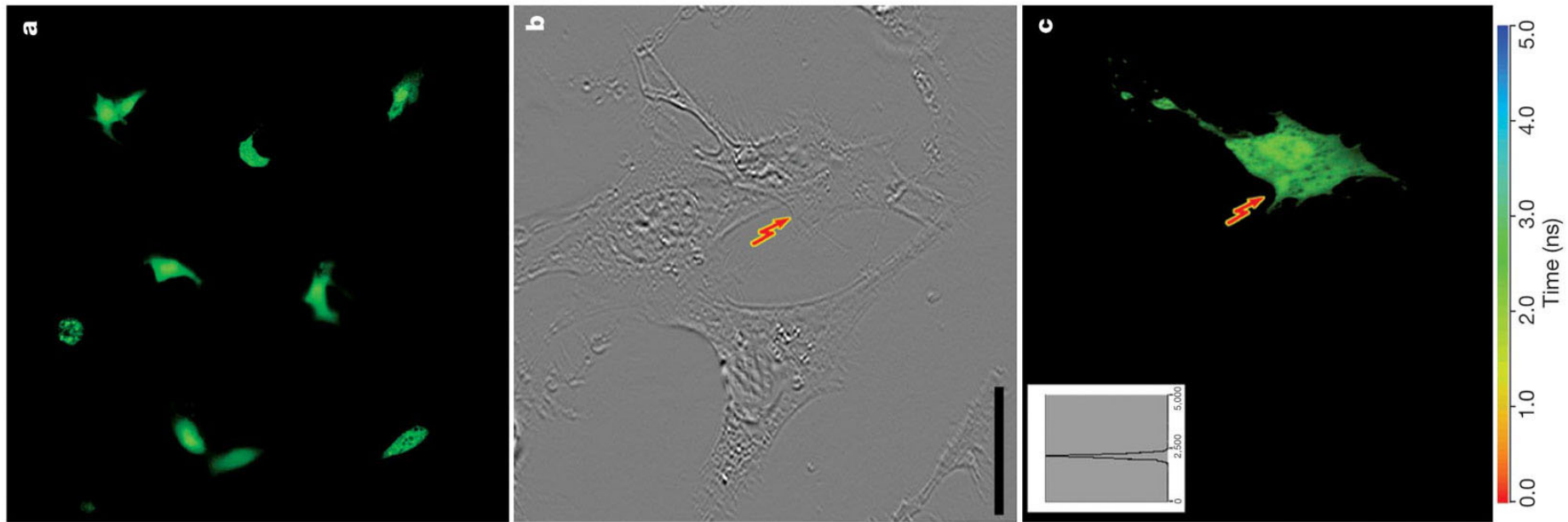
Transplantation de cellules de moelle osseuse  
GFP+.



Injection Hoechst 33342, rhodamine dextran et  
fluorescéine dextran

# Application : transfection localisée

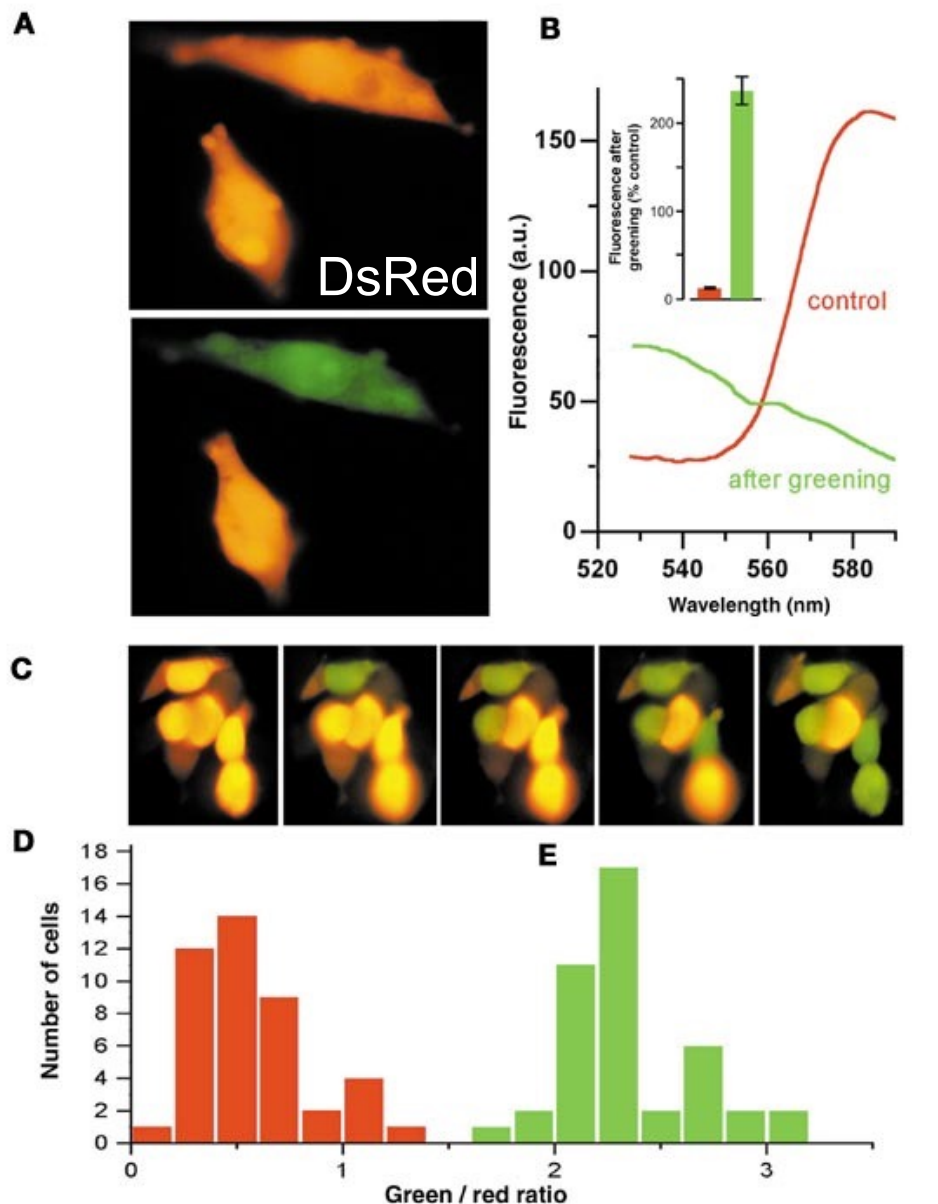
- Cellules CHO, EGFP
- Perforation :  $10^{12}$  W/cm<sup>2</sup>, 16 ms, 800 nm, puissance moyenne 50-100 mW
- 10 à 15 s pour chaque cellule



# Application : suivis de cellules ou de compartiments cellulaires

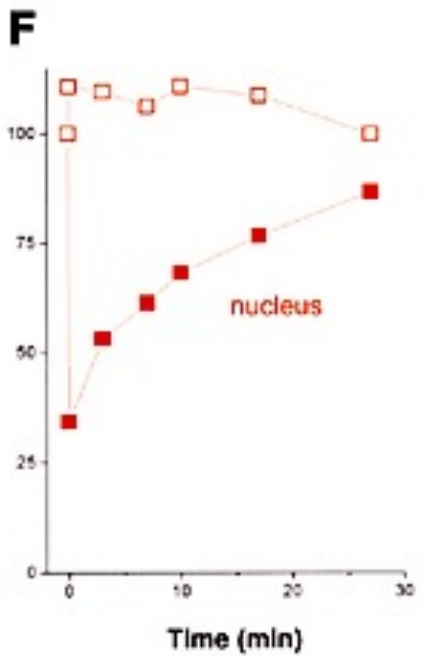
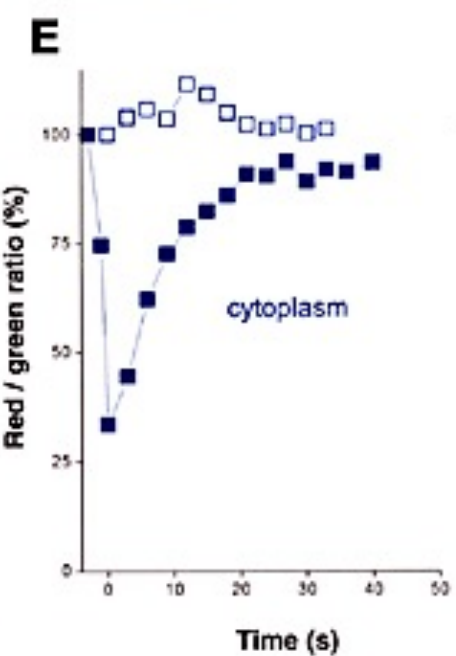
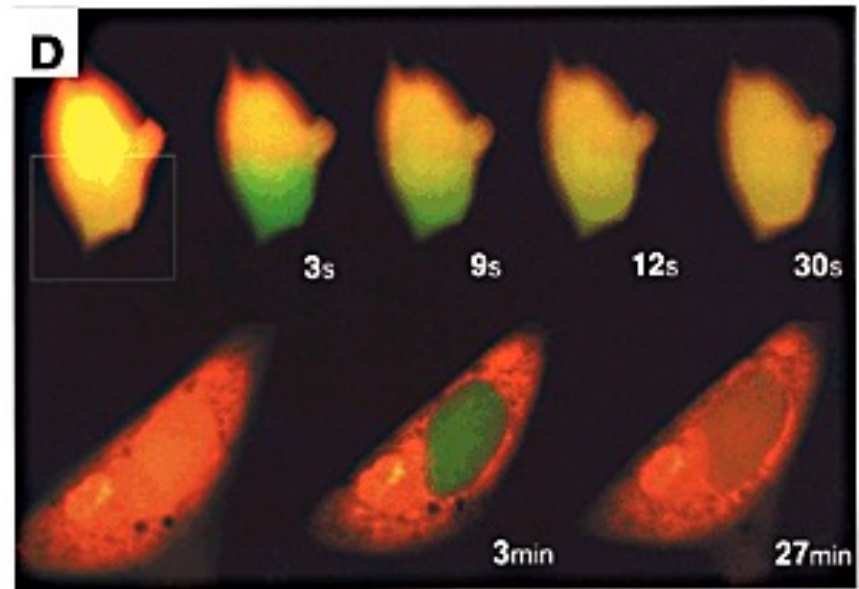
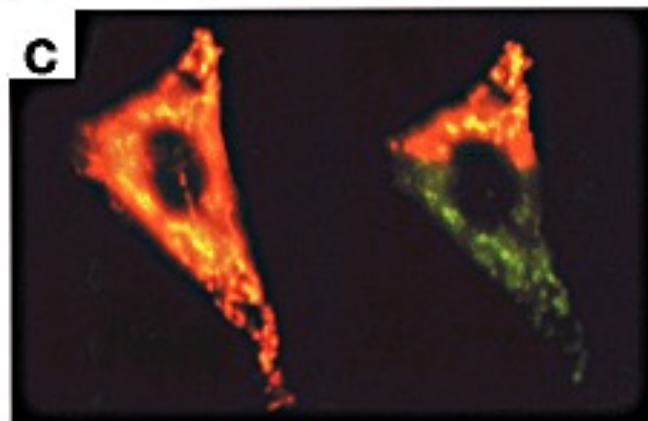
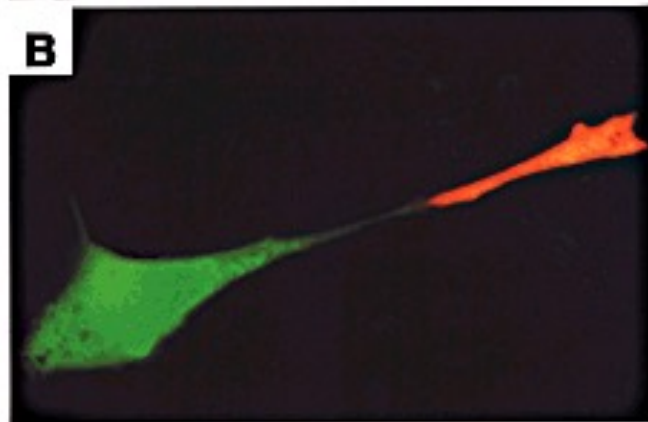
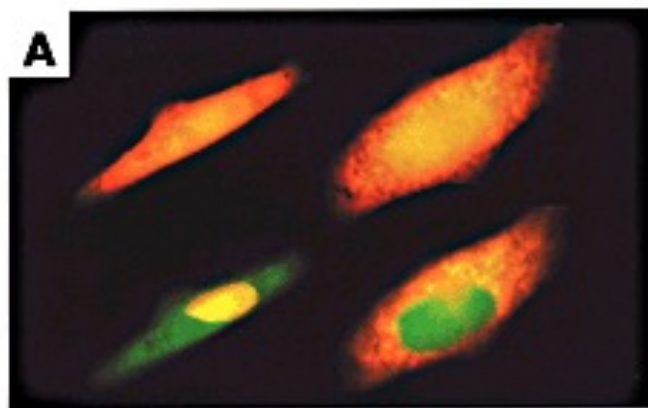
T=0

T = 4s  
750 nm  
25  $\mu$ W

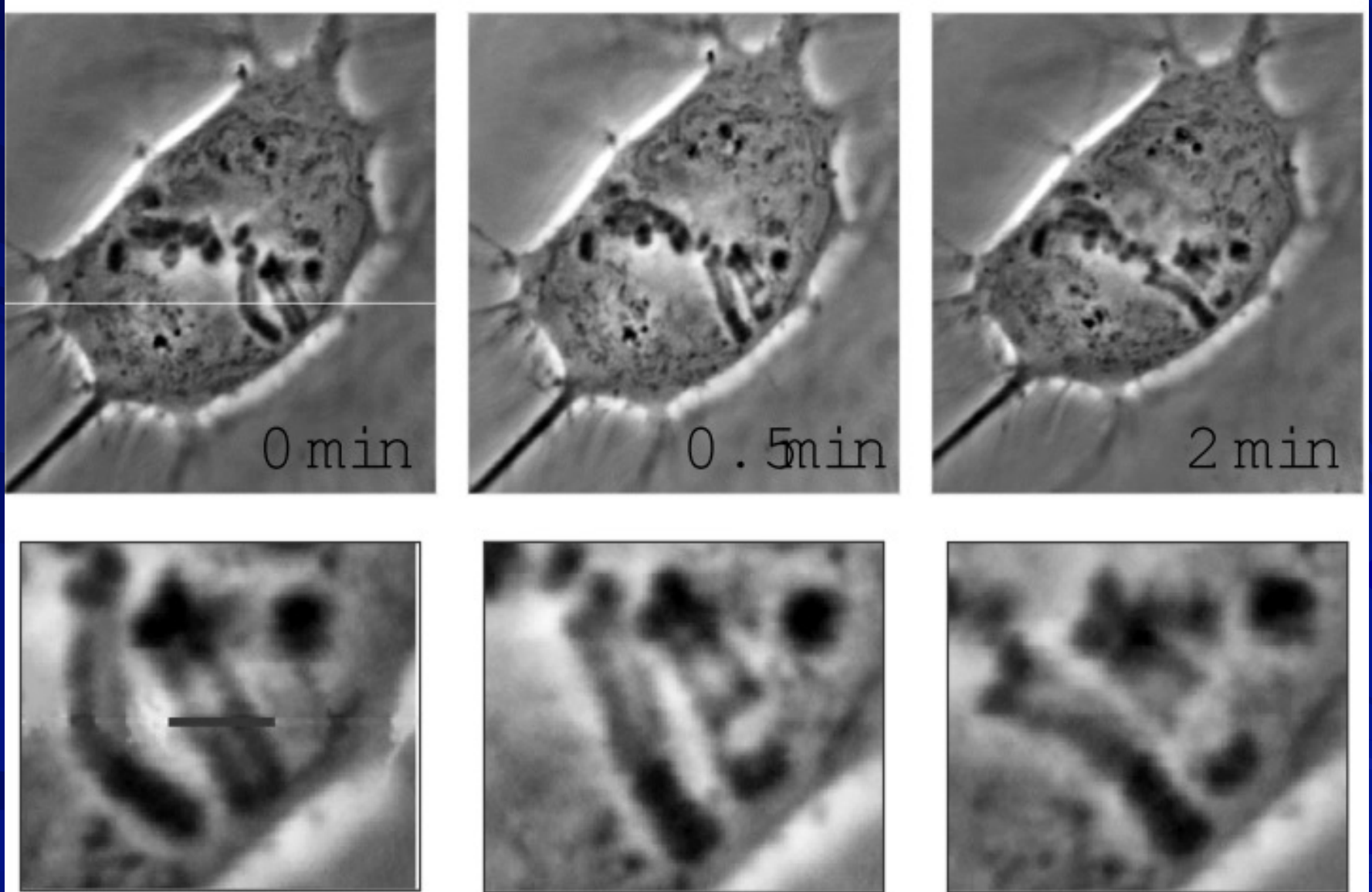


Mécanisme :

1. Bleaching de la forme mature rouge
2. Accroissement de l'émission de la forme immature verte par réduction du FRET

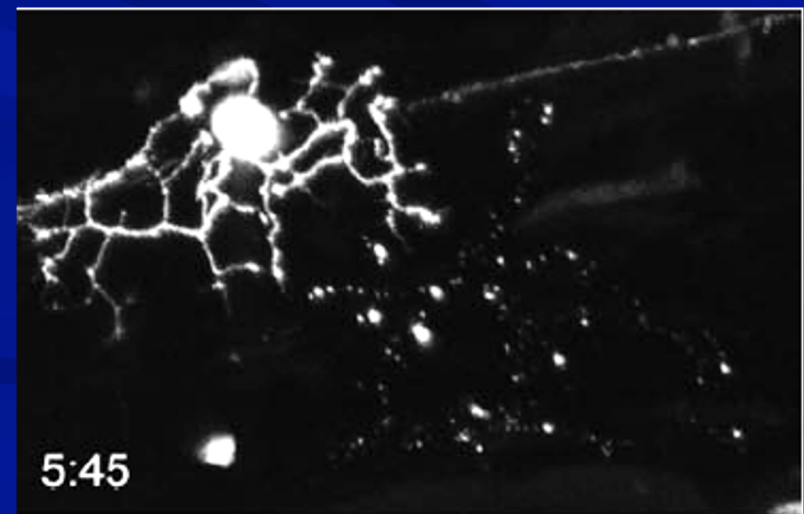
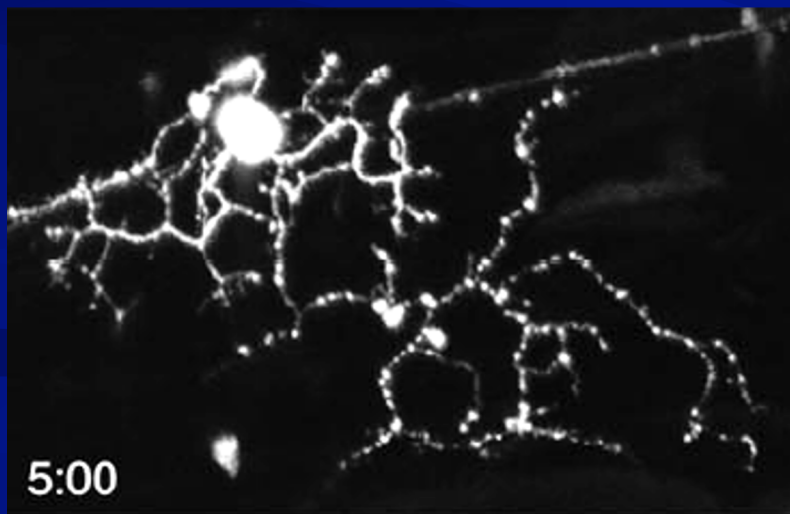
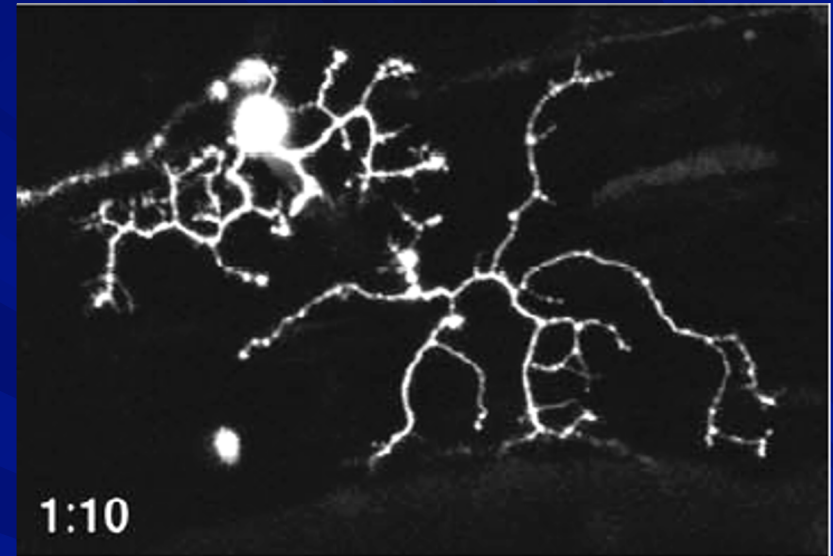
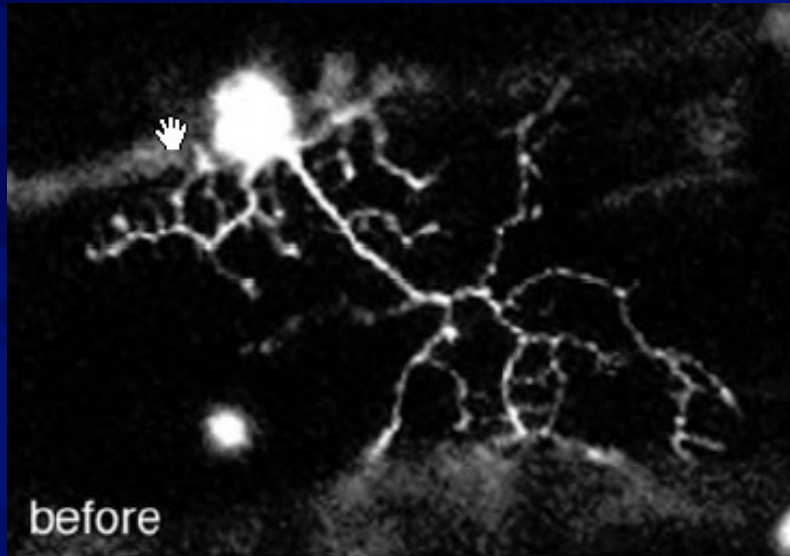


# Application : chirurgie laser dans les cellules vivantes



# Application : chirurgie laser dans les cellules vivantes

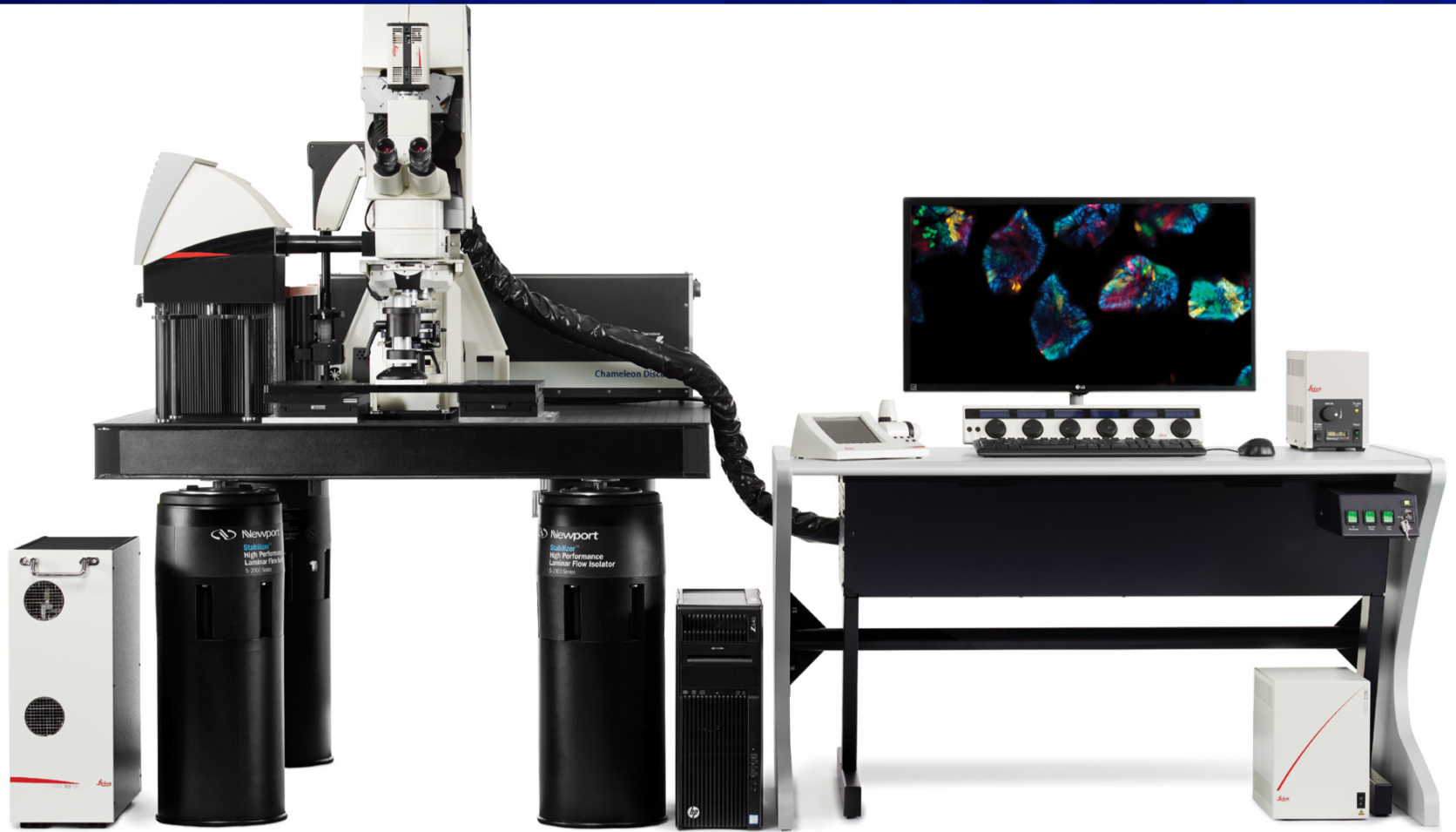
Zebrafish GFP – Neurone de Rohon-Beard

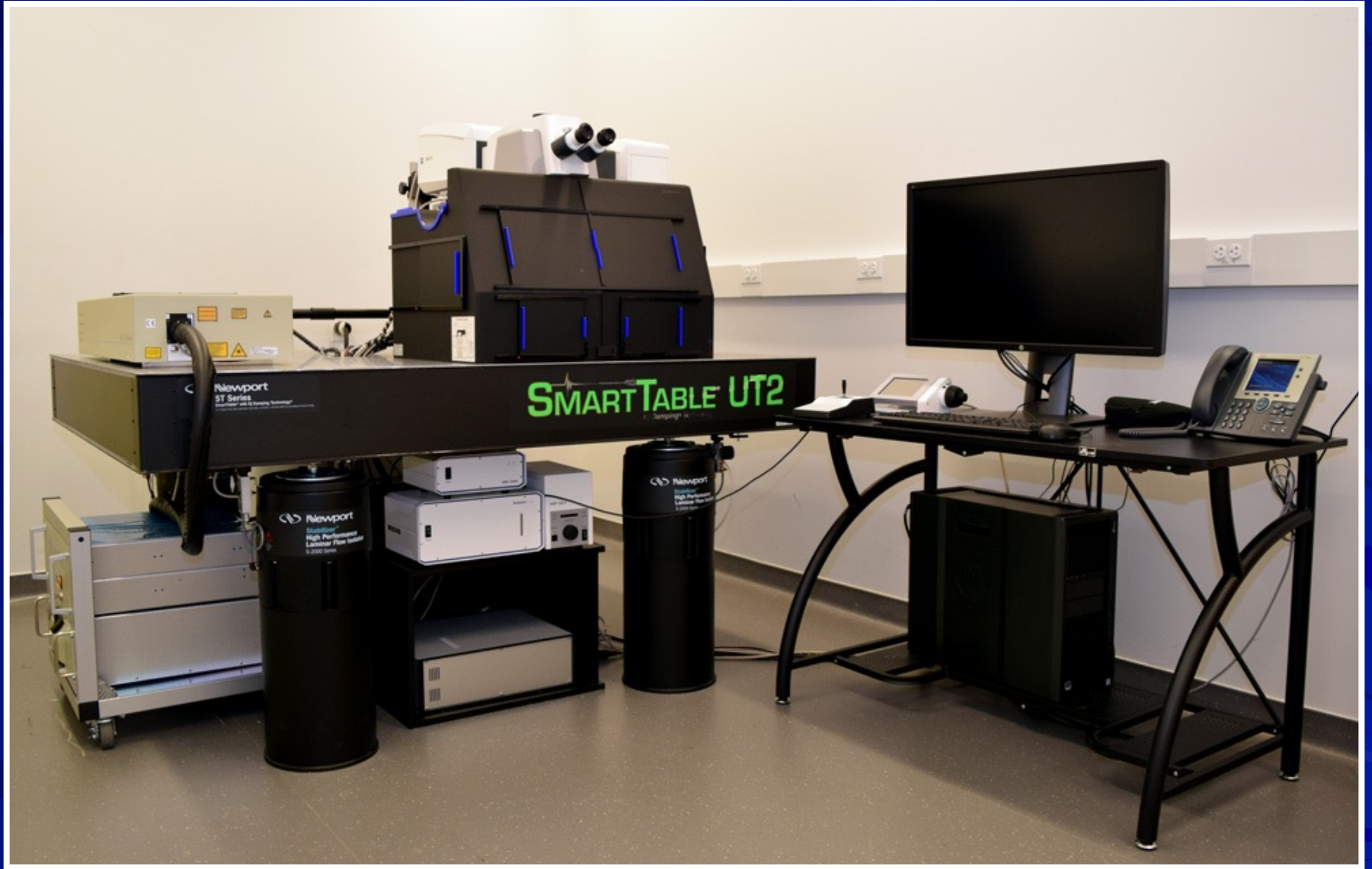












**In Vivo Two-Photon Imaging (-5° to +95° Rotating Body)**  
Configuration B241

